^{15}N-KERNRESONANZ-SPEKTROSKOPIE ORGANISCHER VERBINDUNGEN

INSTRUMENTELLE UND STRUKTURCHEMISCHE BEITRÄGE

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG
DER PHILOSOPHISCHEN DOKTORWÜRDE
vorgelegt der
PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II
DER UNIVERSITÄT ZÜRICH

von

WILLI SCHWOTZER
aus Grub/Eggersriet SG

Begutachtet von Herrn Prof. Dr. W. von Philipsborn

OFFSETDRUCKEREI J. KRAUSE · FREIBURG I. BR.

Zürich 1979

^{15}N-KERNRESONANZ-SPEKTROSKOPIE ORGANISCHER VERBINDUNGEN

INSTRUMENTELLE UND STRUKTURCHEMISCHE BEITRÄGE

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG
DER PHILOSOPHISCHEN DOKTORWÜRDE
vorgelegt der
PHILOSOPHISCHEN FAKULTÄT II
DER UNIVERSITÄT ZÜRICH

von

WILLI SCHWOTZER
aus Grub/Eggersriet SG

Begutachtet von Herrn Prof. Dr. W. von Philipsborn

OFFSETDRUCKEREI J. KRAUSE · FREIBURG I. BR.

Zürich 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Meiner Mutter und dem Andenken
an meinen Vater

Während der Ausführung dieser Arbeit habe ich offene Diskussionen und spontane Unterstützung schätzen gelernt. Ich fühle mich daher den folgenden Kollegen zu grossem Dank verpflichtet:

In erster Linie meinem Lehrer,

Herrn Prof. W. von Philipsborn

der mir durch wertvolle Anregungen und Geduld über erfolglose Zeiten hinweghalf und mich durch Begeisterung über gelungene Experimente anspornte;

Im weiteren Herrn Ing. HTL K. Hochreutener für wesentliche Beiträge beim Probenbau und für das Gastrecht in seinem Laboratorium;

Herrn Hj. Strolz für fachkundige und präzise mechanische Arbeiten;

Frau K. Hochreutener und Frau U. Eberhard für die Ausführung der Zeichnungen und

Fräulein E. Wolf für die sorgfältige Reinschrift des Manuskriptes.

Drei Publikationen sind aus der Zusammenarbeit mit andern Arbeitsgruppen entstanden. Ich danke den Herren M. Llinas (ETH), dipl. chem. Ch. Leuenberger, Dr. L. Hoesch und Dr. J. Bieri für die bereitwillige Herstellung von Substanzen.

Meine Kollegen vom Labor 379 an der Rämistrasse haben zu einer angeregten, heiteren Atmosphäre beigetragen, in der sich wirklich arbeiten liess.

Last, but not least danke ich meiner Frau Ursula für das Verständnis, wenn es 'einmal etwas länger' gedauert hat.

Inhaltsverzeichnis Seite

I. GRUNDLAGEN DER ^{15}N-SPEKTROSKOPIE

1. Einleitung 9

2. Aufnahmetechniken 11

2.1. Indirekte Messung 11

2.2. Direkte Messung 12

3. Die NMR-Parameter 14

3.1. Chemische Verschiebungen 14

3.2. Isotopieverschiebungen 17

3.3. Standard 17

3.4. Kopplungskonstanten 18

3.5. Kern-Overhausereffekt 21

3.4.1. Relaxation schwach gekoppelter Kerne - Solomon-Gleichung 21

3.6. Relaxationsmechanismen 24

3.6.1. Dipolare Relaxation 24

3.6.2. Relaxation durch skalare Kopplung 25

3.6.3. Relaxation durch Spinrotation und Anisotropie der chem. Verschiebung 26

3.7. Möglichkeiten für Signalannullierung 26

3.7.1. Sättigung 27

3.7.2. Kompetitive Relaxation 27

3.7.3. Lange Relaxationszeiten 27

3.7.4. Off-Resonance Entkopplung 28

3.7.5. Inverses Pulsen des Entkopplers 31

3.8. Methoden zur Unterdrückung des NOE 32

II. EIGENE ARBEITEN

1. Spektrometersystem 34

2. Bau eines Probenkopfes für 20 mm Probenröhrchen 34

2.1. Empfängersystem 34

2.2. Anregungssystem 38

2.3. Realisierung 39

2.3.1. Probengehäuse, Spinnerturbine 40

2.3.2. Anregungs- und Empfangssystem 44

2.3.3. Blockschema, Detailschemen 45

2.3.4. Resultate 48

3. Anwendungsbeispiele 53

3.1. ^{15}N-NMR Untersuchungen an Enaminen und Enaminoketonen 54

3.2. Pterine, Folsäure und deren Dihydro- und Tetrahydroderivate 68

3.3. Azimine und Azoxybenzole 83

3.4. ^{15}N-NMR Spektren von lebenden Zellen 89

III. ZUSAMMENFASSUNG 94

IV. LITERATUR 96

I. GRUNDLAGEN DER ^{15}N-SPEKTROSKOPIE

1. Einleitung

Stickstoff ist zweifellos eines der wichtigsten Atome in der anorganischen, organischen und biologischen Chemie. Er kommt in der Natur in zwei stabilen Isotopen vor, welche beide ein magnetisches Moment besitzen (Tab. 1). In der Tat wurden erste Stickstoffresonanzspektren schon in den Anfangszeiten der Kernresonanzspektroskopie gemessen (Proctor & Yu, 1950 [1]), doch einen eigentlichen Aufschwung haben erst die letzten Jahre gebracht. Dies liegt in den besonderen Kerneigenschaften der beiden Isotope begründet (Tab. 1).

Tabelle 1 Konstanten von ^{1}H, ^{13}C, ^{14}N und ^{15}N

Kern	I	μ/μ_K	f_o (2,43T)	rel.Empf.	Nat.Vork.	Gesamtempfindlichkeit
^{1}H	1/2	2,793	100 MHz	1,000	99,98%	1
^{13}C	1/2	0,702	25,2	0,016	1,11%	$1,776\cdot10^{-4}$
^{14}N	1	0,404	7,2	0,001	99,635%	$9,964\cdot10^{-4}$
^{15}N	1/2	-0,283	10,1	0,001	0,365%	$3,650\cdot10^{-6}$

Das Isotop ^{14}N besitzt ein vergleichsweise kleines magnetisches Moment, ist aber wegen seiner grossen natürlichen Häufigkeit dennoch rund 5,7 mal empfindlicher als ^{13}C. Mit seiner Spinquantenzahl I = 1 ist jedoch ein elektrisches Quadrupolmoment assoziiert, welches über den Mechanismus der Quadrupolrelaxation häufig zu Linienbreiten von über 1 kHz führt. Diese können äusserst wertvoll sein: '.... broad lines are often considered as a mere manifestation of life's everyday embarassements. One

may, however, also take up a converse opinion and consider linewidth as a new piece of information' [2]. Der Einsatz der Kernresonanz bei strukturchemischen Problemen indes erfordert präzise chemische Verschiebungsdaten sowie in den meisten Fällen zusätzliche Kopplungsinformation. Beiden Anforderungen kann die ^{14}N Spektroskopie nur in Ausnahmefällen genügen.

Nicht so die ^{15}N-Spektroskopie. Das Isotop mit der Spinquantenzahl I = 1/2 gibt Anlass zu scharfen Linien mit typischen Halbwertsbreiten von weniger als einem Hertz, im Erscheinungsbild ähnlich den ^{13}C Spektren. Die Aufzeichnung der Spektren ist jedoch, bedingt durch das kleine magnetogyrische Verhältnis und das geringe natürliche Vorkommen, ein nicht unbedeutendes Empfindlichkeitsproblem. Erst die instrumentellen Fortschritte der letzten Jahre haben die Beobachtung in der natürlichen Häufigkeit des Isotopen ermöglicht, und dies erklärt auch das zunehmende Interesse an diesem Kern.

2. Aufnahmetechniken

2.1. Indirekte Messung (Heteronukleare INDOR) [3]

Wirkt in einem Molekül zwischen ^{15}N und einem weiteren magnetischen Kern (vorzugsweise H) eine skalare Kopplung, so kann die Resonanzfrequenz des ^{15}N-Kernes in einem heteronuklearen Doppelresonanzexperiment bestimmt werden. Man beobachtet dabei die Intensitätsänderung einer Protonen-Monitorlinie in Abhängigkeit einer Störfrequenz im Bereich der ^{15}N-Resonanzen. So kann die vergleichsweise hohe Empfindlichkeit des Protons zur Detektion des schwachen ^{15}N-Signals ausgenutzt werden. Die folgenden Bedingungen müssen allerdings dabei erfüllt sein:

- Bei Messungen in natürlicher Häufigkeit muss eine Protonen-Linie des ^{15}N-Isotopomeren (^{15}N-Satellit) neben den intensiven Signalen des ^{14}N-Isotopomeren erkennbar sein.
- Es muss eine skalare Kopplung zwischen ^{15}N und dem Monitorkern bestehen.

^{15}N-Satelliten sind in Protonenspektren meist schwer auszumachen, sodass sich die Methode fast ausschliesslich auf hochmarkierte Verbindungen beschränkt.

Eine indirekte Methode zur Bestimmung von (grossen) N,H-Kopplungen wurde von Marchal und Canet [4] vorgeschlagen. Das ^{1}H-Differenzspektrum der ungestörten und ^{15}N-breitbandentkoppelten Probe enthält nur noch die Satellitensignale. Aus Differenz-off-resonanzspektren können sogar die ^{15}N-Frequenzen bestimmt werden. Die Methode blieb bisher auf ^{1}J-Kopplungen beschränkt, da die Basislinie im Bereich der Hauptsignale sehr unstet ist. Mit der Entwicklung hochempfindlicher FT-Geräte haben die indirekten Methoden stark an Bedeutung verloren.

2.2. Direkte Messung [5]

2.2.1. CW-Aufnahmetechnik

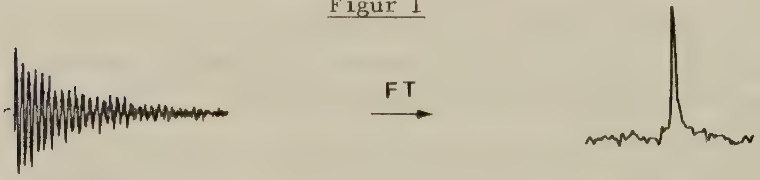
Im CW-Experiment (CW = Continuous Wave) wird die Erregerfrequenz kontinuierlich über den erwarteten Spektralbereich verschoben (frequency sweep).

Da in der Regel ein einziger Durchgang zur Detektion des Resonanzsignals nicht ausreicht, müssen mehrere Sweeps in einem Computer aufsummiert werden (CAT-Verfahren). Dabei verbessert sich das Signal/Rauschverhältnis mit der Quadratwurzel aus der Anzahl Durchgänge: $S/N \sim \sqrt{N}$

2.2.2. Puls-Fouriertransform-Technik

Durch einen kurzen Rf-Puls (5-50 μsec) werden alle N-Resonanzen einer Substanzprobe angeregt. Beobachtet und in einem Computer aufsummiert wird der zeitliche Zerfall der transversalen Magnetisierung (FID). Eine anschliessende Fouriertransformation transformiert das Spektrum aus der Zeitdomäne in die Frequenzdomäne (Fig. 1).

Figur 1



Ernst und Anderson [6] haben den Empfindlichkeitsgewinn der Fourierpulsmethode gegenüber der CW-Methode behandelt. Dabei ist das Signal/Rauschverhältnis (S/N) um einen Faktor $\sqrt{W/\Delta}$ im Fourier Spektrum besser, wobei W den Spektralbereich, Δ eine typische Linienbreite bezeichnet. So ist beispielsweise der S/N Gewinn für W = 5000 Hz und Δ = 1 Hz gleich $\sqrt{5000}$. In linienarmen Spektren und wenn zudem der ungefähre Absorptionsbereich bekannt ist,

verringert sich W und damit der S/N Gewinn.

Die Ueberlegenheit der FT-Pulsspektroskopie widerspiegelt sich auch in der Tatsache, dass sie in neueren Arbeiten die anderen Techniken völlig verdrängt hat. Mehr noch: Das zunehmende Interesse an der ^{15}N-Kernresonanzspektroskopie liegt darin begründet, dass das Isotop durch instrumentelle Verbesserungen nunmehr in natürlicher Häufigkeit beobachtbar ist.

3. Die NMR Parameter

3.1. Chemische Verschiebung

Chemische Verschiebungen des Stickstoffs in diamagnetischen Molekülen umfassen einen Bereich von rund 900 ppm. Eine Zuordnung der Absorptionsintervalle zu den entsprechenden stickstoffhaltigen Substanzklassen findet sich in Fig. 2. Die Empfindlichkeit, welche die chemische Verschiebung gegenüber elektronischen und sterischen Einflüssen zeigt, verleiht ihr eine grosse diagnostische Bedeutung. Dazu ist es allerdings notwendig, die Zusammenhänge zwischen chemischer Verschiebung und molekularer Struktur in irgendeiner Weise voraussagen zu können.

Ab-initio-Berechnungen gehen meistens von der Saika-Slichter-Formulierung [7] des ursprünglich von Ramsey vorgeschlagenen Ansatzes aus

$$\sigma_j = \sigma_j^d + \sigma_j^p + \sum_{i \neq j} \sigma_{ij} \qquad (1)$$

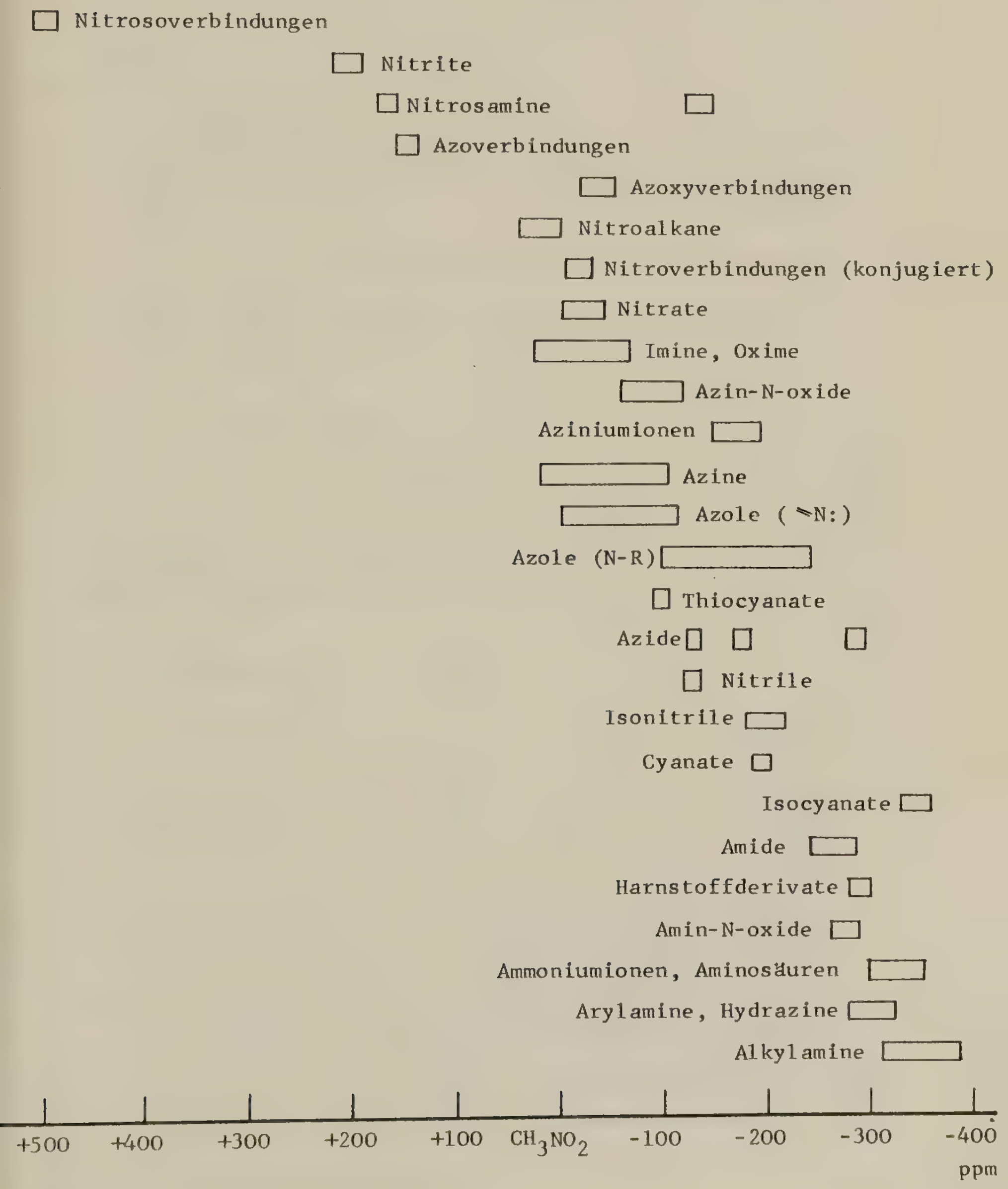
Die σ_j^d und σ_j^p beschreiben dabei die diamagnetischen resp. paramagnetischen Anteile der Elektronen um das Stickstoffatom, während die σ_{ij} von andern Elektronen im Molekül herrühren. σ_j^d kann dabei geschrieben werden als

$$\sigma_j^d = \frac{e^2}{3\,mc^2} \sum_\nu P_{\nu\nu} \left\langle r_{\nu j}^{-1} \right\rangle \qquad (2)$$

$P_{\nu\nu}$ Elektronendichte im Orbital ν

$\left\langle r_{\nu j}^{-1} \right\rangle$ Erwartungswert des reziproken Abstandes vom Kern j für ein Elektron im Orbital ν .

Figur 2 Chemische Verschiebungen des Stickstoffs



Der zweite Term wird gewöhnlich mit einer LCAO-MO-Näherung berechnet. Er kann in der sogenannten 'Average Excitation Energy Approximation' (AEE) auch geschrieben werden als

$$\sigma_j^p = - \frac{e^2\hbar^2}{2\,m^2c^2} \; \frac{\sum_i Q_{ij}}{\Delta E_{av} \langle r^3 \rangle} \qquad (3)$$

Die Q_{ij} sind die Elemente der Ladungsdichte-Bindungsordnungsmatrix.

ΔE_{av} ist die mittlere Anregungsenergie.

$\sum_{i \neq j} \sigma ij$ wird in Berechnungen meistens vernachlässigt, denn ihr Beitrag an der gesamten chemischen Verschiebung ist klein.

Theoretische Berechnungen chemischer Verschiebungen haben sich dann als erfolgreich erwiesen, wenn es darum ging, die grossen Unterschiede zwischen Substanzklassen zu erklären. Sie sind indessen noch nicht genügend verfeinert, um kleinere Effekte wie Substituenteneinflüsse oder Ladungspolarisierungen, nachzuvollziehen [8].

Aus einer qualitativen Betrachtung gehen folgende Punkte hervor:

- Der paramagnetische Term ist negativ und zeigt mit zunehmender Ladungsdichte eine dem diamagnetischen entgegenlaufende Tendenz. Während letzterer nur von $\langle r^{-1} \rangle$ abhängt, ist σ^p eine Funktion von $\langle r^{-3} \rangle$.
- Der Term ΔE_{av} ist eher eine Rechenvereinfachung als eine messbare physikalische Grösse. Eine lineare Abhängigkeit von andern spektroskopischen Grössen (etwa dem langwelligsten UV-Maximum) besteht nur in Ausnahmefällen.

Daraus leitet sich folgendes Caveat ab: Voraussagen N-chemischer Verschiebungen nur aufgrund von Elektronen-

dichteüberlegungen können völlig fehlgehen.

Befriedigendere Resultate als ab-initio-Rechnungen haben, besonders für grössere organische Moleküle, semiempirische Ansätze gezeigt [9].

3.2 Isotopieverschiebungen

Vergleiche chemischer Verschiebungen von ^{14}N und ^{15}N haben keinen signifikanten Unterschied ergeben. Dies bedeutet, dass

$$\frac{1 - \sigma_i(^{15}N)}{1 - \sigma_i(^{14}N)} < 10^{-7} \qquad [10] \qquad (4)$$

Relative Verschiebungen von ^{14}N und ^{15}N können innerhalb der Fehlergrenzen verglichen werden. Dabei muss für praktische Anwendungen berücksichtigt werden, dass ^{14}N-Messungen wegen der auftretenden Linienbreiten mit erheblichen Unsicherheiten behaftet sind (mehrere ppm), während ^{15}N-Daten innerhalb von $\pm$ 0,1 ppm Genauigkeit liegen.

3.3. Standard

Die Genauigkeit der Bestimmung ^{15}N-chemischer Verschiebungen ist besser als 0,1 ppm, die Abweichungen von Literaturdaten für ein und dieselbe Verbindung hingegen sind von der Grössenordnung ppm. Diese Unterschiede können einerseits auf die Empfindlichkeit ^{15}N-chemischer Verschiebungen gegenüber Solvenseffekten, aber auch auf die Verwendung unterschiedlicher Standardverbindungen zurückgeführt werden. In neuerer Zeit haben sich zwei ausführliche Arbeiten mit diesem Problem beschäftigt [11] [12]. Uebereinstimmend kommen die Autoren zum Schluss, dass von allen bisher üblichen Referenzverbindungen ledig-

lich externes Nitromethan die an eine Referenz gestellten Anforderungen zu erfüllen vermag:

a) Als reine Flüssigkeit ist es in seiner Konzentration definiert.

b) Seine chemische Verschiebung weist einen äusserst kleinen Temperaturkoeffizienten auf, eine Bedingung, die vor allem bei Messungen in grossvolumigen Proberöhrchen wichtig wird, weil hier besonders bei Rauschentkopplung durch mangelnde Konvektion innerhalb der Substanzprobe Temperaturgradienten von 1-2^{o}C auftreten können.

Die Vorzeichenwahl für die relativ zu Nitromethan gemessenen chemischen Verschiebungen wird ebenfalls nicht einheitlich gehandhabt. Nach Konvention sollten Verschiebungen nach höheren Frequenzen ein positives Vorzeichen [13] erhalten, wie sich dies in der ^{1}H-und ^{13}C-Spektroskopie eingebürgert hat. Auf diese Weise erhält die Mehrzahl der Verschiebungen organischer Substanzen negatives Vorzeichen. Dies mag eine Anzahl ^{15}N-Spektroskopiker dazu verleitet haben, entgegen der Konvention zu handeln. Es ist denkbar, dass in der Folge ein virtueller Standard bei sehr tiefer Frequenz definiert wird. Dabei würden die chemischen Verschiebungen experimentell nach wie vor relativ zu Nitromethan bestimmt und anschliessend auf den virtuellen Standard umgerechnet. Die Absolutbeträge dieser nunmehr positiven Verschiebungen würden sich der ^{1}H und ^{13}C Spektroskopie besser angleichen (grösserer Betrag entspricht stärkerer Hochfrequenzverschiebung).

3.4. Kopplungskonstanten

Nach Ramsey kann indirekte Spin-Spin-Kopplung in drei Typen von Mechanismen aufgeteilt werden [14]:

J^{Fc} Fermikontakt-Wechselwirkung zwischen Elektronen- und Kernspin

J^{O} Wechselwirkung zwischen dem magnetischen Feld aus der Orbitalbewegung des Elektrons und dem kernmagnetischen Dipol

J^{Sd} Wechselwirkung zwischen Kern- und Elektronenspindipol

Berechnungen von N,H- und N,C-Kopplungskonstanten führten in einigen Arbeiten zu guten Resultaten sowohl in Bezug auf das Vorzeichen wie auf den Betrag [15-18].

Derartige Berechnungen sind schwierig und zeitraubend. Für die Anwendung von Kopplungskonstanten bei Strukturproblemen wurden deshalb empirische Formeln entwickelt.

N,H-Kopplungen über eine Bindung

$^{1}J(N,H)$: $\% s = 0{,}43\ ^{1}J(N,H) - 6$ [19] (5)

und $\% s = 0{,}34\ ^{1}J(N,H)$ [20] (6)

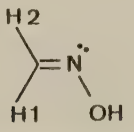
Daraus ergibt sich für die Formel von Binsch (5) ein Bereich zwischen 65 und 120 Hz, für diejenige von Randall (6) 73 und 147 Hz. Ein Vergleich mit experimentellen Werten zeigt, dass die Binsch-Gleichung für ungeladene, die Randall'sche für geladene (quartäre) N-Atome die Messwerte besser annähert.

Geminale N,H-Kopplungskonstanten, deren Kopplungsweg über ein sp^3-Atom verläuft, sind klein (0 bis 2 Hz). Verläuft der Kopplungsweg hingegen über ein sp^2-Atom, so können Konstanten bis 16 Hz auftreten. $^{2}J(N,H)$ zeigen eine sehr interessante Abhängigkeit von der Konfiguration, welche auch theoretisch nachvollzogen wurde [15]. So ist im Fall sterischer Fixierung immer die Kopplungskonstante zu demjenigen Wasserstoffatom betragsmässig grösser, welches

synperiplanar zum freien Elektronenpaar steht. Im Oxim in Fig. 3 ist

$^{2}J(N,H(1)) = 2{,}6\ \text{Hz} \qquad ^{2}J(N,H(2)) = 13{,}8\ \text{Hz}$ [21]

Figur 3



Vicinale N,H-Kopplungskonstanten folgen wie die $^{3}J(H,H)$- oder $^{3}J(C,H)$-Kopplungen einer Karplus-ähnlichen Beziehung [22][23].

Für N,C-Kopplungskonstanten über eine Bindung wurde wie für die $^{1}J(N,H)$ eine empirische Gleichung abgeleitet. Ihr Anwendungsbereich ist allerdings durch neuere theoretische Arbeiten stark eingeschränkt [16][17]. Für die Formulierung

$$^{1}J(C,N) = -0{,}0125 \cdot \%S_{C}\ \%\ S_{N} \qquad [19] \qquad (7)$$

wurde angenommen, dass hauptsächlich der Fermi-Kontakt-Term dominierend ist. Dies scheint dann nicht zuzutreffen, wenn die C,N-Bindung ein Nitril, Isocyanid oder Nitriloxid ist oder die C,N-Einfach- oder Doppelbindung einsame Elektronenpaare mit s-Anteil aufweist.

Geminale N,C-Kopplungen zeigen die gleiche Abhängigkeit von der Orientierung des freien Stickstoffelektronenpaares wie die geminalen N,H-Kopplungen. Sie können bei der sonst recht schwierigen Konfigurationszuordnung von N=N- und C=N-Doppelbindungen klärend eingesetzt werden [24].

3.5. Der Kern - Overhausereffekt

Der Overhausereffekt (NOE) nimmt in der ^{15}N-Spektroskopie einen gewichtigen Platz ein. Das magnetogyrische Verhältnis von ^{15}N ist klein und negativ (Tab. 1). Der maximal durch N-{H}-Doppelresonanz erreichbare Overhauserfaktor beträgt [25]:

$$\eta_{max} = 1/2 \frac{\gamma_H}{\gamma_N} = -4.98 \qquad (8)$$

Die durch Bestrahlen der H-Resonanzen induzierte Kernpolarisierung ist daher gegenüber der Richtung des ungestörten Systems invertiert:

$$\left(\frac{M_z}{M_z^o}\right)_{max} = 1 + \eta_{max} = -3.98 \qquad (9)$$

Grundsätzlich erfahren also im Protonen-rauschentkoppelten ^{15}N-Spektrum die Signale eine Erhöhung um maximal einen Faktor vier, sofern der volle NOE wirksam ist; eine Empfindlichkeitssteigerung also, auf die man bei Arbeiten in der natürlichen Isotopenhäufigkeit selten verzichten kann. Sind allerdings die Randbedingungen so, dass nicht der volle NOE ausgenützt werden kann, so wendet sich dieser Vorteil in sein Gegenteil: für $\eta \simeq -1$ ist das Signal grundsätzlich nicht mehr beobachtbar. Die Kenntnis der Grössen, welche den NOE beeinflussen, ist für den ^{15}N-Spektroskopiker von vitalem Interesse.

3.5.1. Relaxation schwach gekoppelter Kerne - Solomon-Gleichung

Betrachtet werden zwei Spin-1/2 Kerne I und S, für welche die folgenden Bedingungen gelten:

$$J(IS) \ll \nu_0 \delta(IS)$$
$$\gamma(I) = -\gamma(S)$$
$$|\gamma(I)| < |\gamma(S)|$$

Es handelt sich dabei um die Bedingungen für einen AX-Fall.

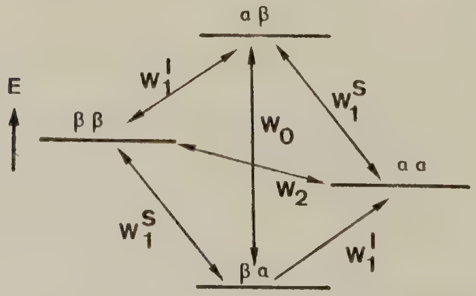
Die longitudinale Magnetisierung M_z^I ist proportional zum Erwartungswert des Kernspinoperators $\hat{I}$.

$$M_z^I = N \gamma \hbar \langle \hat{I}_z \rangle \quad \text{wobei} \quad \langle \hat{I}_z \rangle = \sum_i M_k^i P_i$$

M_k^i ist die Quantenzahl von $\hat{I}_z(k)$, P_i die Population des i-ten Niveaus.

Das Solomon-Schema für diesen AX-Fall findet sich in Fig. 4.

Figur 4



$$\langle \hat{I}_z \rangle = -1/2\ (P_1 - P_2 + P_3 - P_4)$$
$$\langle \hat{S}_z \rangle = 1/2\ (P_1 + P_2 - P_3 - P_4)$$

Gleichung (12) beschreibt den zeitlichen Zerfall von I_z nach einer Störung

$$\frac{d\langle\hat{I}_z\rangle}{dt} = -\rho_I\,(\langle\hat{I}_z\rangle - I_o) - \sigma_{IS}\,(\langle\hat{S}_z\rangle - S_o) \qquad (12)$$

$\rho_I = 2\,W_1^I + W_o + W_2$ beschreibt die normale Dipol-Dipol-Relaxation

$\sigma_{IS} = W_2 - W_o$ beschreibt die Kreuzrelaxation zwischen den Spins I und S

Experimentell ist $\langle\hat{I}_z\rangle$ proportional zur gesamten integrierten Signalintensität der NMR-Resonanz des I-Spins.

Für Sättigung des S-Kerns ($\langle\hat{S}_z\rangle = 0$) und thermisches Gleichgewicht ($\frac{d\langle\hat{I}_z\rangle}{dt} = 0$) erhält man für

$$\eta = \frac{M_z(I)-M_z^o(I)}{M_z^o(I)} = \frac{\sigma_{IS}}{\rho_I}\cdot\frac{\gamma_S}{\gamma_I} = \frac{W_2 - W_o}{2W_1^I + W_o + W_2}\cdot\frac{\gamma_S}{\gamma_I} \qquad (13)$$

Eine Verallgemeinerung des AX-Falles auf ein System mit einem I- und mehreren nichtäquivalenten S-Kernen stammt von Kuhlmann et al. [26]. In einem derartigen System lautet die Gleichung für den NOE bei Bestrahlung der S-Kerne (Rauschentkopplung)

$$\eta = \frac{\gamma_S}{\gamma_I}\;\frac{\sum\sigma_{SI}}{\rho_I^* + \sum\rho_I} \qquad (14)$$

ρ_I^* beschreibt alle nicht dipolaren Wechselwirkungen.

3.6. Relaxationsmechanismen

3.6.1. Dipolare Relaxation

Zwei magnetische Dipole im Abstand r koppeln mit einer Energie

$$E_{dd} \sim \vec{\mu}_1 \cdot \vec{\mu}_2 \, r^{-3}$$

In Lösung wird diese Energie durch die rasche Bewegung der Moleküle zu Null gemittelt. Als Relaxationsmechanismus ist die dipolare Kopplung dennoch wirksam. Die Uebergangswahrscheinlichkeiten betragen bei dipolarer Relaxation [26]

$$W^{I}_{1dd} = 3/20 \; A \; \frac{\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} \tag{15}$$

$$W_{odd} = 1/10 \; A \; \frac{\tau_c}{1 + (\omega_s - \omega_I)^2 \tau_c^2} \tag{16}$$

$$W_{2dd} = 3/5 \; A \; \frac{\tau_c}{1 + (\omega_S + \omega_I)^2 \tau_c^2} \tag{17}$$

$$A = \gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2 r^{-6}$$

Ist die 'extreme narrowing condition' erfüllt, d.h. $\omega^2 \tau_c^2 << 1$, so werden die Relaxationsraten

$$\rho_I^{dd} = \frac{1}{T_1^{dd}(I)} = \frac{\gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2 \tau_c}{r^6} \qquad (18)$$

und

$$\sigma_{IS} = 1/2 \; \rho_I \qquad (19)$$

3.6.2. Relaxation durch skalare Kopplung

Die Energie bei skalarer Kopplung beträgt

$$E_{sc} = J \; \vec{I} \cdot \vec{S}$$

Als Relaxationsmechanismus wird die skalare Kopplung dann wirksam, wenn entweder J oder $\vec{S}$ zeitabhängig sind.

J ist zeitabhängig bei chemischem Austausch oder intramolekularer Dynamik. Die Gleichung für die Relaxationszeit bei skalarer Kopplung lautet

$$1/T_1^{sc} = \rho^{sc} = 8/3 \; \pi^2 J^2 S(S+1) \frac{\tau_{sc}}{1+(\omega_S-\omega_I)^2 \tau_{sc}^2} \qquad (20)$$

Den maximalen Beitrag liefert dieser Mechanismus, wenn $\tau_{sc} = \frac{1}{\Delta\omega}$

Es stellt sich die Frage, ob dieser Relaxationsmechanismus überhaupt je mit den andern zu konkurrenzieren vermag. Typische ^1J – Kopplungskonstanten zwischen Stickstoff und leicht austauschbaren Protonen übersteigen 100 Hz in den seltensten Fällen. Für ein Feld von 2,34T wird damit $(\rho^{sc})_{max} = 3{,}5 \; 10^{-4} \; sec^{-1}$, was gleichbedeutend ist mit einer longitudinalen Relaxationszeit T_1^{sc} von 2800 sec.

Der Beitrag der Relaxationsrate $1/T_1^{sc}$ zur Gesamtrelaxationsrate ist also in jedem Fall vernachlässigbar klein [27].

Anstelle von J kann auch $\vec{S}$ zeitabhängig sein. Dies liefert dann einen erheblichen Beitrag, wenn die Differenz der Kreisfrequenzen von I und S sehr klein ist und zudem gilt

$$2\pi J \simeq \frac{1}{\tau_{sc}}$$

Bekanntes Beispiel für diesen Mechanismus ist die Wechselwirkung zwischen ^{13}C und ^{79}Br. Im Falle von ^{15}N existiert kein stabiles magnetisches Isotop mit ähnlicher Larmorfrequenz.

3.6.3. Relaxation durch Spin-Rotation und Anisotropie der chemischen Verschiebung

Beide Mechanismen spielen bei ^{15}N-Relaxationsprozessen eine Rolle, wenn nicht der dipolare Mechanismus dominierend ist. Dies ist sehr häufig dann der Fall, wenn das Stickstoffatom kein direkt gebundenes Proton trägt [28-30].

3.7. Möglichkeiten für Signalannullierung

Verringerung oder gar Annullierung der Signalintensität durch Protonen-Breitbandentkopplung tritt häufiger auf, als man dies bei oberflächlicher Betrachtung der Overhausergleichung (13) erwarten würde. Bedenkt man im weiteren, dass man in der ^{15}N-Spektroskopie ohnehin fast immer an der Detektionsgrenze arbeitet, so erklärt sich leicht, dass allein schon eine Verminderung der Signalintensität eine Messung in Frage stellen kann. Im folgenden werden experimentelle Parameter diskutiert, welche bei unsachgemässer Wahl zum Misserfolg führen.

3.7.1. Sättigung

Die Möglichkeit einer Sättigung durch eine zu rasche Pulsfolge ist nicht ^{15}N-spezifisch. Sie wird hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt.

Die Abhängigkeit der in einer Zeitspanne T_o akkumulierten Signalintensität vom Flipwinkel und dem Verhältnis von T_1 zur Pulsrepetitionsrate ist in Formel (21) wiedergegeben [31].

$$S(\theta,r) = \frac{K(\sin\theta)(e^r - 1)}{(T_1 T_o)^{1/2}\, r^{1/2}(e^r - \cos\theta)} \tag{21}$$

Dabei ist K eine Konstante, θ der Flipwinkel und t der Pulsabstand. r ergibt sich aus $r = t/T_1$.

Es kann gezeigt werden, dass optimale Messbedingungen vorliegen, wenn $t = 0{,}5\ T_1$ und $\theta = 50\text{-}60^o$.

3.7.2. Kompetitive Relaxation

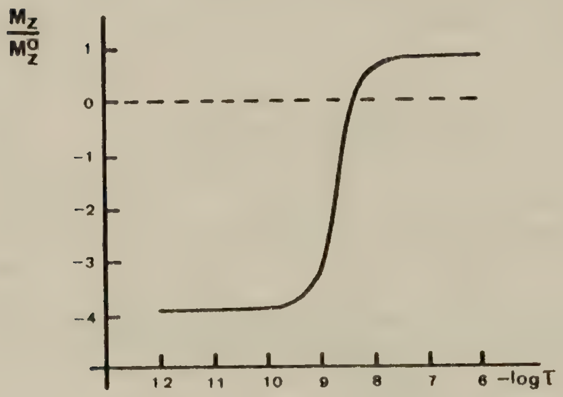
Da $1/T_1^{dd} \sim \gamma_N^2$ gilt (Formel 18), ist die dipolare N,H-Relaxation wegen des kleinen Absolutbetrages von γ_N nur etwa 1/4 so effektiv wie im C,H-Fall. Dadurch werden andere Relaxationsmechanismen konkurrenzfähig, wodurch η eine Verringerung erfährt(14). Besondere Erwähnung verdienen in diesem Zusammenhang Verunreinigungen mit paramagnetischen Metallionen. Diese bilden bevorzugt Komplexe über das freie N-Elektronenpaar und stellen somit einen ausgezeichneten Relaxationsmechanismus dar.

3.7.3. Lange Korrelationszeiten

Wird die 'extreme narrowing condition' nicht mehr erfüllt, so nimmt mit zunehmender Korrelationszeit der NOE ab, obschon die Relaxation ausschliesslich dipolar ist. Die theoretische Abhängigkeit des NOE von τ_c ist für den AX-

Fall in Fig. 5 dargestellt. Der Rechnung (Formeln 13, 15-17) wurde ein äusseres Magnetfeld von 2,34T zugrunde gelegt.

Figur 5



Signalannullierung findet in einem Bereich um $\tau = 2 \cdot 10^{-9}$ sec statt. Der Effekt konnte am Beispiel des Gramicidin S verifiziert werden [32]. Er kann aber auch bei weniger rigiden Molekülen in Fällen hochviskoser Lösungen auftreten (H-Brücken, hohe Konzentrationen, etc.).

3.7.4. Off-Resonance Entkopplung

Ein maximaler Kern-Overhausereffekt kann nur dann auftreten, wenn die entsprechenden H-Linien gesättigt sind. Dies wurde in Gleichung (13) dadurch berücksichtigt, dass $\langle S_z \rangle = 0$ gesetzt wurde. Wird nun ein ^{15}N-Spektrum unter Bedingungen der Off-Resonance oder selektiver Entkopplung aufgenommen, kann diese Randbedingung verletzt sein.

Diese Möglichkeit kann im AX-Fall quantitativ behandelt werden. Die Lösung der Bloch'schen Gleichungen für die stationäre Entkopplerkreisfrequenz ω_2 lautet

$$M_z^S(\omega_2) = M_o \frac{1 + T_2^2(\omega_o - \omega_2)^2}{1 + T_2^2(\omega_o - \omega_2)^2 + S_2} \tag{22}$$

ω_o ist dabei die Larmorkreisfrequenz des S-Kerns
ω_2 ist die Entkopplerkreisfrequenz und
S_2 ist der Sättigungsfaktor $S_2 = \gamma^2 H_2^2 T_1 T_2$

Für einen genügend grossen Frequenzabstand gilt

$$(\omega_o - \omega_2)^2 \, T_2^2 \gg 1 \tag{23}$$

sodass die Magnetisierung des S-Kerns in Funktion des Frequenzabstandes vom Entkoppler lautet

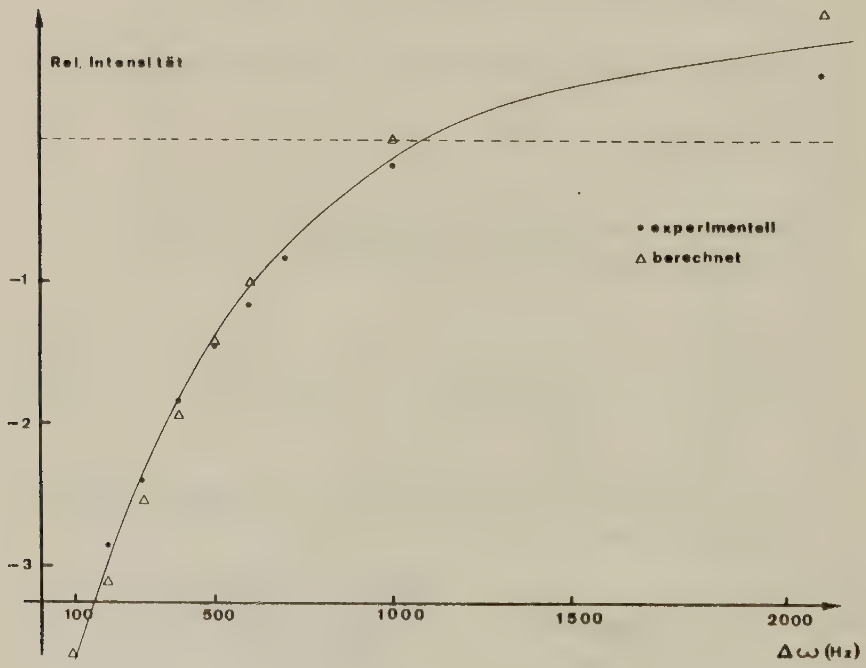
$$\frac{M_z^S}{M_o} = \frac{1}{1 + \dfrac{S_2}{(\omega_o - \omega_2)^2 T_2^2}} \tag{24}$$

Eingesetzt in Gleichung (14) und unter Annahme von Gleichgewicht ergibt sich ein reduzierter NOE

$$\eta = \eta_{max} \left(1 - \frac{1}{1 + \dfrac{(\gamma H_2)^2}{(\omega_o - \omega_2)^2}}\right) \tag{25}$$

Fig. 6 zeigt den Vergleich von gemessenen und berechneten relativen Signalintensitäten in Abhängigkeit der Offset-

frequenz für ein vorgegebenes H_2 Feld. Testsubstanz war ^{15}N-Phthalimid, welches in guter Näherung einem AX-System entspricht. Die Feldstärkebestimmung geschah aufgrund reduzierter Kopplungskonstanten mit Hilfe der von Ernst [33] vorgeschlagenen Gleichung. Einsetzen konkreter Zahlenwerte für γH_2 zeigt, dass in einem üblichen Off-Resonanz Experiment ($\gamma H_2 \simeq$ kHz) keine Signalannullierung zu erwarten ist. Bei selektiven Entkopplungen ($\gamma H_2 <$ 1kHz) allerdings ist diesem Effekt Sorge zu tragen.

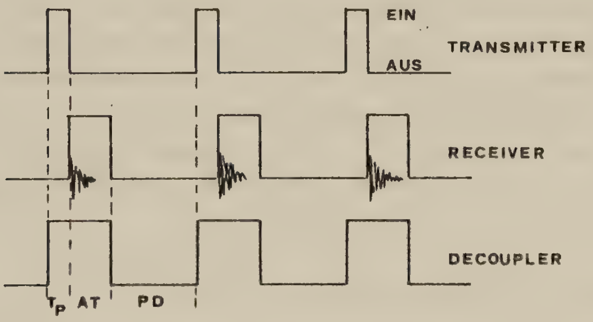


Figur 6. Abhängigkeit der Signalintensität von der Offset-frequenz bei ^{15}N-Phthalimid in d_6-DMSO. Die Energie des Entkopplerfeldes betrug γH_2 = 499 Hz

3.7.5. Inverses Pulsen des Entkopplers

In Fällen eines ungünstigen NOE erscheint es oft von vornherein ratsam, gänzlich darauf zu verzichten. Trotzdem soll der Empfindlichkeitsgewinn,welcher das entkoppelte Spektrum durch Signalkollaps erfährt, ausgenützt werden. Dies geschieht mit der von Freeman [34] vorgeschlagenen Pulssequenz des Entkopplerkanales (Fig. 7).

Figur 7



Wiederum für den AX-Fall lauten die Solomon-Gleichungen

$$\frac{dM_z^I}{dt} = -R_I \, (M_z^I - M_o^I) - \Sigma_{IS} \, (M_z^S - M_o^S) \qquad (26)$$

Die Gleichung für die Magnetisierung des S-Kerns ist von analoger Form.

$R_I = 1/T_1^I$ kann in eine dipolare und eine nicht-dipolare Komponente zerlegt werden:

$$R_I = R_{dd} + R_I' \quad ; \quad \Sigma_{IS} = 1/2 \; R_{dd}$$

Der Aufbau des NOE nach Einschalten des Entkopplerfeldes ist eine Funktion von T_1 des Stickstoffatoms allein [35].

$$\ln (M_z(t=\infty) - M_z(t)) = t/T_1^I + \ln (M_z^I(t=\infty) - M_o^I) \quad (27)$$

Nach Abschalten des Entkopplers am Ende der Acquisitionszeit baut sich die Kernpolarisierung wieder ab. Canet [36] hat die entsprechenden Bestimmungsgleichungen für den AX-Fall gelöst und zeigen können, dass der NOE doppelt exponentiell mit den longitudinalen Relaxationen der I und S-Kerne abklingt. Für $T = 5\ T_1^I$ ist der Abbau dann am unvollständigsten, wenn $T_1^I \simeq T_1^S$. Wird indessen der Entkoppler während $10\ T_1^I$ abgeschaltet, dann ist die Restpolarisierung in jedem Fall $< 2\%$. Daraus leitet sich ab, dass im Falle von inversen Entkopplerpulsen das Ein/Aus Verhältnis sorgfältig bedacht werden muss.

3.8. Methoden zur Unterdrückung des NOE

In Fällen, bei denen auch nach längerer Messzeit von ausreichend konzentrierten Lösungen kein Signal erhalten wird, empfiehlt es sich, den NOE völlig zu unterdrücken. Die dazu geeigneten Methoden sind in den vorangehenden Kapiteln vorgezeichnet und werden an dieser Stelle nur noch zusammengefasst:

- Paramagnetische Relaxationsreagentien unterdrücken durch kompetitive Relaxation den NOE. Gleichzeitig werden die Gesamtrelaxationszeiten verkürzt. Dies gestattet die Verwendung höherer Pulsrepetitionsraten ohne dass Sättigung eintritt. Ein möglicher Einfluss von Relaxationsreagentien auf chemische Verschiebungsdaten wurde untersucht [37]. Es hat sich gezeigt, dass bei geeigneter Wahl des Standards die induzierten Verschiebungen klein sind.

- Inverses Pulsen des Entkopplerkanals vermeidet bei geeignetem Ein/Aus Verhältnis ebenfalls den Aufbau einer dynamischen Polarisierung. Zur Verkürzung der Relaxationszeiten wird diese Methode am besten mit einem Relaxationsreagens kombiniert.

II. EIGENE ARBEITEN

1. Spektrometersystem

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit verfügten wir über ein VARIAN XL-100-15-Spektrometersystem, das mit den zur ^{15}N-Beobachtung notwendigen Einheiten (Frequenzerzeugung, Empfängersystem) ausgerüstet war. Damit liessen sich Arbeiten an ^{15}N-angereicherten Proben (s. II/3.3. und II/3.4.) oder an hochkonzentrierten Lösungen mit natürlicher Isotopenhäufigkeit (II/3.2.) ausführen. Die Messzeit für Lösungen mit Konzentrationen von weniger als 1,5 M überschritten indes auch unter voller Ausnutzung des NOE jedes verantwortbare Mass.

Ziel der im folgenden Kapitel beschriebenen instrumentellen Verbesserungen war, die Empfindlichkeit des bestehenden Spektrometersystems zu erhöhen und damit auch grössere, schwerer lösliche organische Moleküle einer Beobachtung in natürlicher Isotopenhäufigkeit zugänglich zu machen. Diese instrumentellen Verbesserungen sind in Kapitel II/2 beschrieben. Anwendungsbeispiele der ^{15}N-Spektroskopie, mit Schwergewicht auf der Beobachtung des natürlich vorkommenden Isotopen sind Inhalt von Abschnitt II/3.

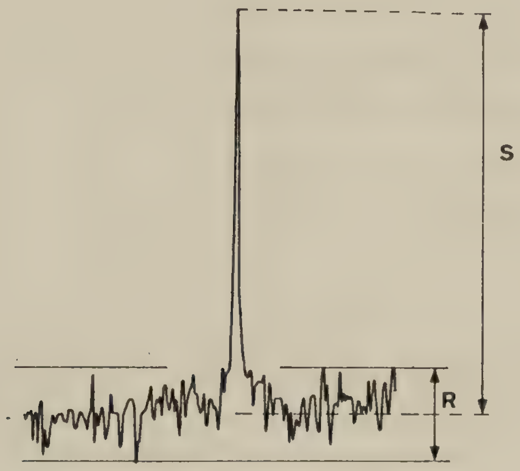
2. Bau eines Messkopfes für 20 mm Probenröhrchen

2.1. Empfängersystem

Die Darstellung der Response einer Substanzprobe auf die Anregung geschieht üblicherweise so, dass die in der Empfängerspule induzierte Signalspannung in Abhängigkeit der Frequenz aufgetragen wird. Jedes Signal ist zusätzlich von stochastischem Rauschen begleitet. Die Empfindlichkeit eines Experimentes wird charakterisiert durch

das Verhältnis von Signalhöhe zu mittlerem Rauschpegel und wird als Signal/Rauschverhältnis (S/N) bezeichnet (Fig. 8).

Figur 8



$$S/N = \frac{\text{Signalspannung}}{\text{mittlerer Rauschpegel}} = \frac{S}{0{,}4R} \tag{28}$$

S/N hängt von verschiedenen Faktoren ab. Eine oft zitierte Formulierung stammt von Abragam [38].

$$S/N = K\,\eta\,M_o \sqrt{\frac{\mu_o \omega_o V_c Q}{4FkT_c \Delta f}} \tag{29}$$

Dabei bedeuten:

- K = Numerischer Faktor (≃1 für solenoide Empfängerspule)
- η = Füllfaktor der Empfängerspule
  $\eta = V_s/2V_c$ für Solenoid
- V_s = Volumen der Substanzprobe
- V_c = Volumen in der Empfängerspule
- F = Rauschzahl des Empfängers
- T_c = Temperatur der Empfängerspule
- Δf = Bandbreite des Empfängers
- Q = Qualitätsfaktor der Spule

Trotz ihrer Brauchbarkeit beim Vergleich verschiedener Konstruktionen ist (29) keine fundamentale Gleichung. Während K nicht direkt gemessen werden kann, ist η nur für eine solenoide Spule definiert. Deutliche Grenzen wurden der Anwendbarkeit von (29) beim Uebergang zu Hochfeldgeräten gesetzt. Die erwartete Empfindlichkeitssteigerung mit der 3/2ten Potenz der Larmorfrequenz wurde experimentell nicht verifiziert. Hoult und Richards [39] haben aus diesen Gründen das Problem der Abhängigkeit des S/N Verhältnisses von instrumentellen Parametern neu überdacht. Den Berechnungen liegt das Prinzip der Reziprozität zugrunde: Anstatt die durch einen magnetischen Dipol induzierte EMK zu berechnen, wird das von einem Einheitsstrom in verschiedenen Spulengeometrien induzierte Feld bestimmt. Die daraus resultierende Gleichung hat die Form:

$$S/N = \frac{K(B_1)_{xy} \cdot V_s N \gamma \hbar^2 I(I+1)}{7{,}12 k T_s} \left(\frac{p}{F k T_c l \zeta \Delta f} \right)^{1/2} \frac{\omega_o^{7/4}}{\left(\mu \mu_o \rho(T_c) \right)^{1/4}} \qquad (30)$$

Geometriefaktoren der Empfängerspule:

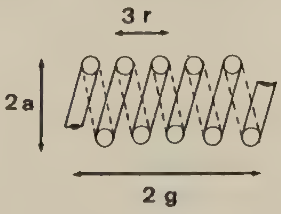
$K(B_1)_{xy}$	Effektives Feld, welches durch einen Einheitsstrom in der Empfängerspule über dem Probenvolumen erzeugt wird
p	Umfang der Spule
l	Länge des Leiters
ξ	Proximity-Factor, ersetzt η und Q der Abragam'schen Formel

Im weiteren ist:

$\rho(T_c)$	Materialkonstante
T_c	Spulentemperatur
T_p	Probentemperatur

Gleichungen (29) und (30) sind für solenoide Empfängerspulen identisch.

Für ein Solenoid der Form



$$\text{wird } (B_1)_{xy} = \frac{\mu_o n}{2} \frac{1}{[a^2+g^2]^{1/2}} \quad (n \gg 1) \qquad (31)$$

Ist $g \simeq a$, so wird $(B_1)_{xy} = 0{,}354n \frac{\mu_o}{a}$ und $l \simeq 2\pi an$ oder $l \simeq 6{,}3\ na$ ebenfalls

$$p = \frac{4\pi a}{3(n-1)} \quad \text{resp.} \quad n \gg 1 \quad p \simeq 4{,}2\ \frac{n}{a}$$

Damit wird bei vorgegebener Feldstärke, Kernart und Materialkonstante

$$S/N \sim \frac{V_s \cdot N}{a \cdot T_s} \sqrt{\frac{1}{\Delta f \cdot F \cdot T_c}} \qquad (32)$$

Bei den herkömmlichen Konstruktionen lassen sich sowohl Probentemperatur wie Spulentemperatur nur unwesentlich beeinflussen. Verbesserungen im S/N können erreicht werden:

a) Durch Vergrösserung des Probenvolumens V_s

b) Durch Erhöhung der Spindichte (N) (höhere Konzentration resp. Anreicherung eines seltenen Isotopen)

c) Durch Einengen der Empfängerbandbreite

d) Durch Erniedrigen des thermischen Rauschpegels von Empfängerspule und Vorverstärker (T_c, F)

2.2. Das Anregungssystem

In der PFT-Spektroskopie werden alle Uebergänge innerhalb eines Frequenzbereiches durch einen modulierten RF-Puls angeregt [5]. Im rotierenden Koordinatensystem präzediert während dem Puls die Magnetisierung $\vec{M}$ um das effektive Feld, welches gegeben ist durch

$$\left|\vec{H}_{eff}\right| = \frac{1}{\gamma} \left[(\omega_i - \omega)^2 + (\gamma H_1)^2 \right]^{1/2} \qquad (33)$$

ω_i = Kreisfrequenz des i-ten Kernes

ω = Kreisfrequenz des Koordinatensystems

Ist $\gamma H_1 \gg 2\pi\Delta\nu$, so kann $(\omega_i - \omega)$ vernachlässigt werden. Gleichung (33) reduziert sich zu

$$\vec{H}_{eff} \approx \vec{H}_1 \tag{34}$$

d.h. die Magnetisierung präzediert um $\vec{H}_1$ für alle Kerne i innerhalb Δ.

Dies bedeutet für den 90^o Puls, dass

$\gamma H_1 t_p = \frac{\pi}{2}$ und mit

$\gamma H_1 \gg 2\pi\Delta$ wird

$$t_p \ll \frac{1}{4\Delta} \tag{35}$$

Betrachtet man den Puls als Envelope einer Rechteckfunktion, so ergeben sich die Nullstellen bei $\nu_o \pm 1/t_p$, d.h. für eine homogene Anregung des Spektrums müssen die Pulszeiten möglichst kurz sein.

γH_1 ist zum einen abhängig von der Leistung des Pulsverstärkers, zum andern aber auch von der Geometrie der Sendespule. Ein Vergleich von sattelförmiger Helmholtzspule (wie sie in der crossed-coils-Anordnung der Varian 4412 und 4415 Proben vorliegen) und einem Solenoid zeigen, dass bei gleicher Leistung des Pulsverstärkers bei letzterem etwa dreimal kürzere Pulsdauern resultieren. Dies wurde auch experimentell bestätigt [39].

2.3. Realisierung

Das bestehende Spektrometersystem, ein XL-100-15, arbeitet mit einem Elektromagneten von 2,3T Feldstärke. Der Luftspalt zwischen den Polschuhen beträgt 33 mm. Die Empfänger-

spule ist ein Solenoid, welche auf einem Quarzglasinsert befestigt ist, der Probenröhrchen von 12 mm Durchmesser aufzunehmen vermag. Beim 10,1 MHz-Vorverstärker handelt es sich um eine klassische Kaskodenschaltung, deren hohe Eingangsimpedanz den Empfangsschwingkreis minimal belastet [40]. Eine kritische Betrachtung von Gleichung (32) unter diesen Prämissen zeigt, dass eine wesentliche Steigerung des S/N-Verhältnisses nur durch eine Vergrösserung des Probenvolumens erreicht werden kann, und auch dies nur unter den folgenden Bedingungen:

a) Die Auflösung darf unter der Vergrösserung des Probenvolumens nicht leiden; d.h. die Qualität des Magneten muss einen homogenen Bereich von der Grössenordnung der Substanzprobe garantieren.

b) Die Anregung des Spinsystems muss über das ganze Probenvolumen sowie über den ganzen Spektralbereich homogen sein.

c) ^{1}H-Breitbandentkopplung muss möglich sein. Die damit verbundene Erwärmung der Probe darf ein von der Stabilität der Substanz her gegebenes Mass nicht überschreiten ($<40^{o}$C).

2.3.1. Probengehäuse, Spinnerturbine

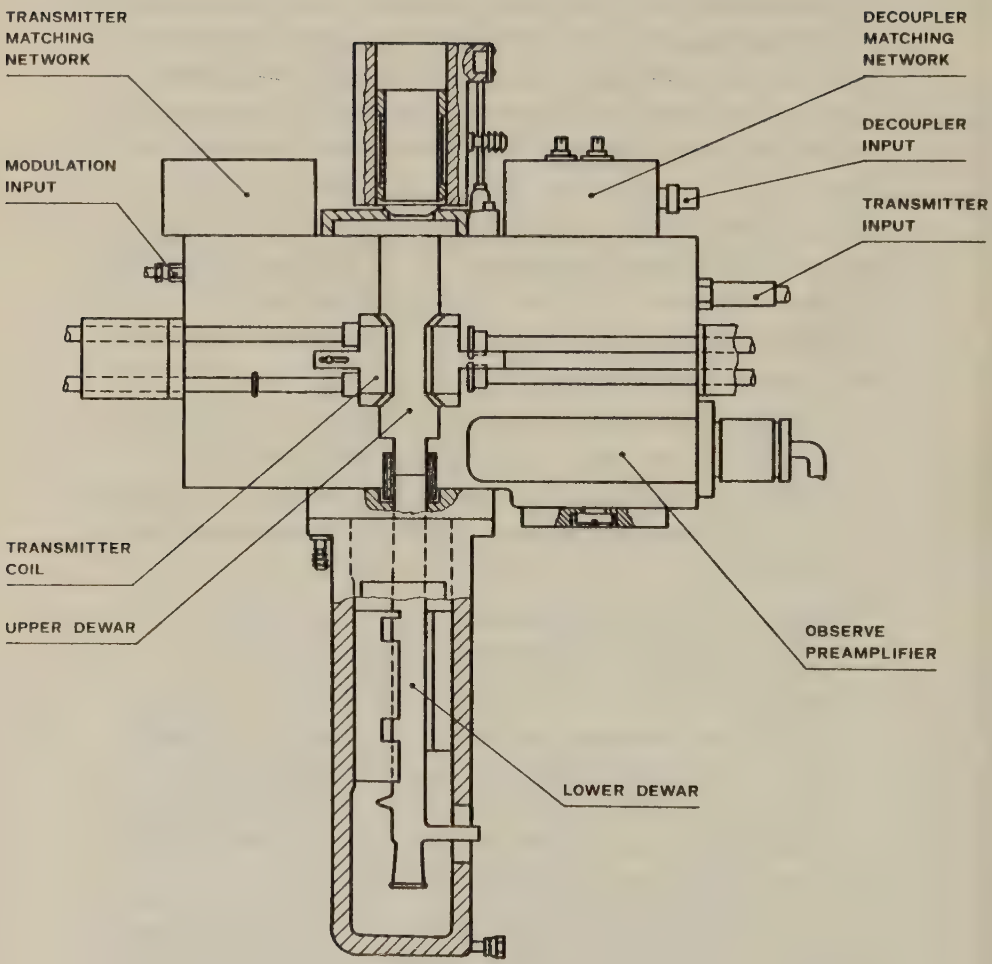
Das VARIAN 4415 Probengehäuse unterscheidet sich von neueren Konstruktionen dadurch, dass es mit 30 mm Breite den ganzen Luftspalt des 15-inch Magneten ausfüllt. Dementsprechend grosszügig ist die Platzgestaltung im Innern (Fig. 9a) [41]. Die Doppelresonanzspulen sitzen auf einem Quarzglasdewar von 25 mm Durchmesser, der die kernspezifische, auswechselbare Inserthülse mit den Empfängerspulen beherbergt. Die sattelförmigen Transmitterspulen sind in Helmholtzanordnung auf Keramiksockeln befestigt. Empfänger-, Entkoppler- und Transmitterspulen sind je

zueinander orthogonal angeordnet, um direktes induktives Uebersprechen der Kanäle zu minimalisieren. Unten an den Insertdewar anschliessend und über Kunststoffbriden damit verbunden ist ein weiteres röhrenförmiges Dewargefäss montiert, in welchem ein Fühler-Heizelement die Kühllufttemperatur von der variablen Temperatureinheit aus kontrolliert.

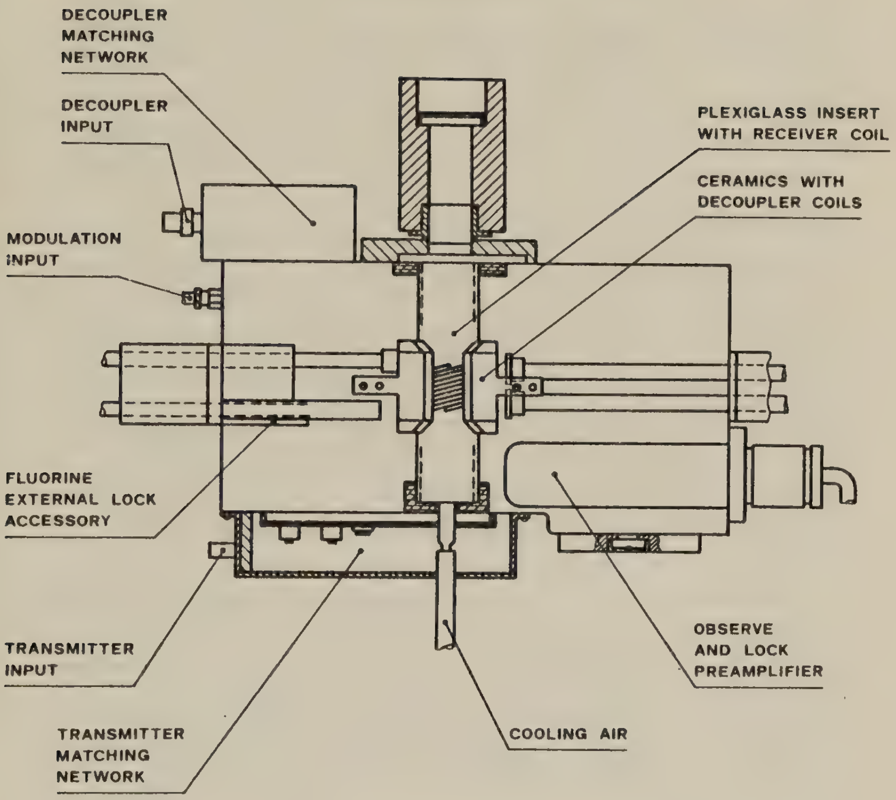
Aus einem derartigen Probengehäuse wurde das obere Dewargefäss mit den Doppelresonanzspulen gegen einen selber konstruierten Insert für 20 mm Probenröhrchen ersetzt. Die Wahl des Röhrchendurchmessers von 20 mm geschah aufgrund der folgenden Kriterien:

- Nachdem Messungen mit einem kommerziellen ^{13}C-Probenkopf für 18 mm Röhrchen im 12-inch Magneten ausgezeichnete Auflösung gezeigt hatten (VARIAN 4418), schien eine weitere Vergrösserung des Probevolumens im 15-inch Magneten durchaus möglich zu sein.
- Gegenüber den 12 mm Röhrchen wurde eine Volumenvergrösserung von einem Faktor 6 erreicht.
- Käufliche Präzisionsröhrchen waren zu Beginn der Arbeit in den Durchmessern 25, 20, 18 und 15 mm erhältlich. Bei einem Insert für 25 mm Proberöhrchen würden sich Empfängerspule und Gehäuse überkritisch nähern, sodass durch magnetische und elektrostatische Wechselwirkungen Q erniedrigt würde [39].

Die Spinnerturbine wurde eigens für die schweren Probenröhrchen neu konzipiert. Sie besteht aus eloxiertem Aluminium und zeigt den in Fig. 9b gezeigten Aufbau. Auf eine Tachometeranzeige wurde verzichtet, da die für eine bestimmte Substanzprobe optimale Drehzahl vor jedem Experiment anhand des ^{2}H-Lösungsmittelsignals eingestellt wird. Mit Hilfe einer Stroboskoplampe konnte nachgewiesen werden, dass Drehzahlen von 10-15 rps ohne weiteres erreicht werden können.



Figur 9a VARIAN 4415-Probe



Figur 9b   20 mm Probenkopf

2.3.2. Anregungs- und Empfangssystem

In Vorversuchen wurde die 'Crossed-Coil'-Anordnung der V 4415 Probe übernommen. Es zeigte sich, dass die Leistung des Pulsverstärkers für eine homogene Anregung nicht genügte. Die Dauer für einen 90^o-Puls betrug mehr als 200 µsec, wodurch die Bedingung $t_p < 1/4\Delta$ (35) nicht erfüllt war.

Grundsätzlich konnte eine Verkürzung des 90^o-Pulses auf zwei Arten bewirkt werden: Die Möglichkeit, die Pulsleistung durch einen zusätzlichen Verstärker zu erhöhen, wurde von Ellis [42] gewählt. Wir haben uns entschlossen, statt dessen auf eine Single-Coil-Anordnung überzugehen, was uns gegenüber dem Crossed-Coil-System eine Verbesserung von mindestens einem Faktor 3 in der 90^o-Puls-Dauer eintragen sollte. Dies hat sich experimentell auch bestätigt.

Für die Konzeption der Empfängerspule wurde auf [39] Bezug genommen. Bei der Leitung hochfrequenter Wechselströme muss der Skin-Effekt berücksichtigt werden. Damit ist gemeint, dass derartige Ströme nicht auf dem ganzen Leiterquerschnitt, sondern lediglich in einer Oberflächenschicht fliessen, deren Tiefe im wesentlichen frequenzabhängig ist. Wir verwenden eine Spule aus einer Silberlegierung (80% Ag, 20% Cu) mit einem Draht-Querschnitt von 0,8 mm. Sie wird auf einem Plexiglasinsert in einem Gewinde von 1 mm Ganghöhe festgehalten. 20 Windungen ergeben eine Spule mit einer Induktivität von 12,4 µH, welche zusammen mit einer Trimmkapazität von 16-27 pF den Empfangsschwingkreis bildet. Das eingeschlossene Probevolumen beträgt 6 cm^3. Ein Vergleich mit der Empfangsspule des kommerziellen 12 mm Inserts lässt einen S/N-Gewinn von einem Faktor 3,6 erwarten.

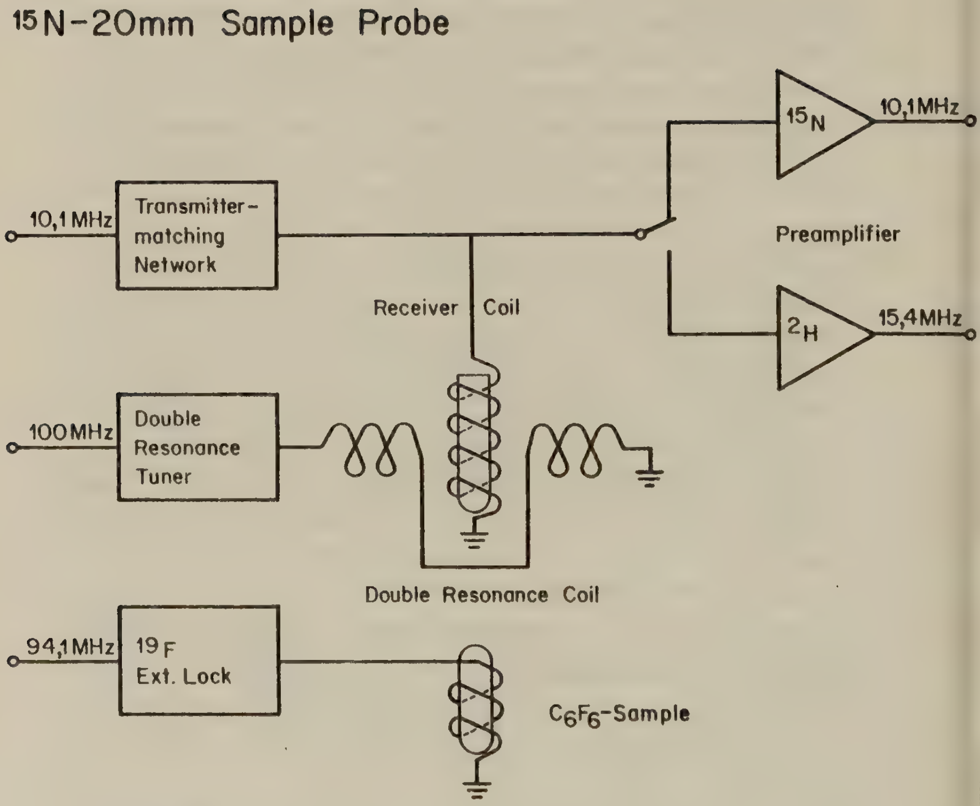
2.3.3. Blockschema, Detailschemen

Das Blockschema der 20 mm Probe ist in Fig. 10 dargestellt. Der Rf-Puls wird über ein Anpassungsnetzwerk in die Sende-Empfängerspule eingekoppelt. Diese bildet mit einer Drehkapazität innerhalb des ^{15}N-Vorverstärkers einen auf 10,1 MHz abgestimmten Resonanzkreis (s. Detailschema). Die Feld-Frequenzstabilisierung geschieht während der Messung grundsätzlich mit Hilfe eines externen Fluor-Locksystems. Auf die Möglichkeit einer internen Feld-Frequenzstabilisierung mit Hilfe des ^{2}H-Resonanzsignals des Lösungsmittels wurde verzichtet, weil zur Auftrennung von Beobachtungs- und Lockfrequenz mehrere Bandpassfilter notwendig geworden wären. Trotzdem kann vor der Messung das Magnetfeld am ^{2}H-Lösungsmittelsignal homogenisiert werden. Dazu wird die Empfängerspule mit einem von aussen zu bedienenden Schalter auf den 15,4 MHz Vorverstärker umgeschaltet. Dieses ^{2}H-Detektionssystem weist ebenfalls eine Single-Coil-Konfiguration auf.

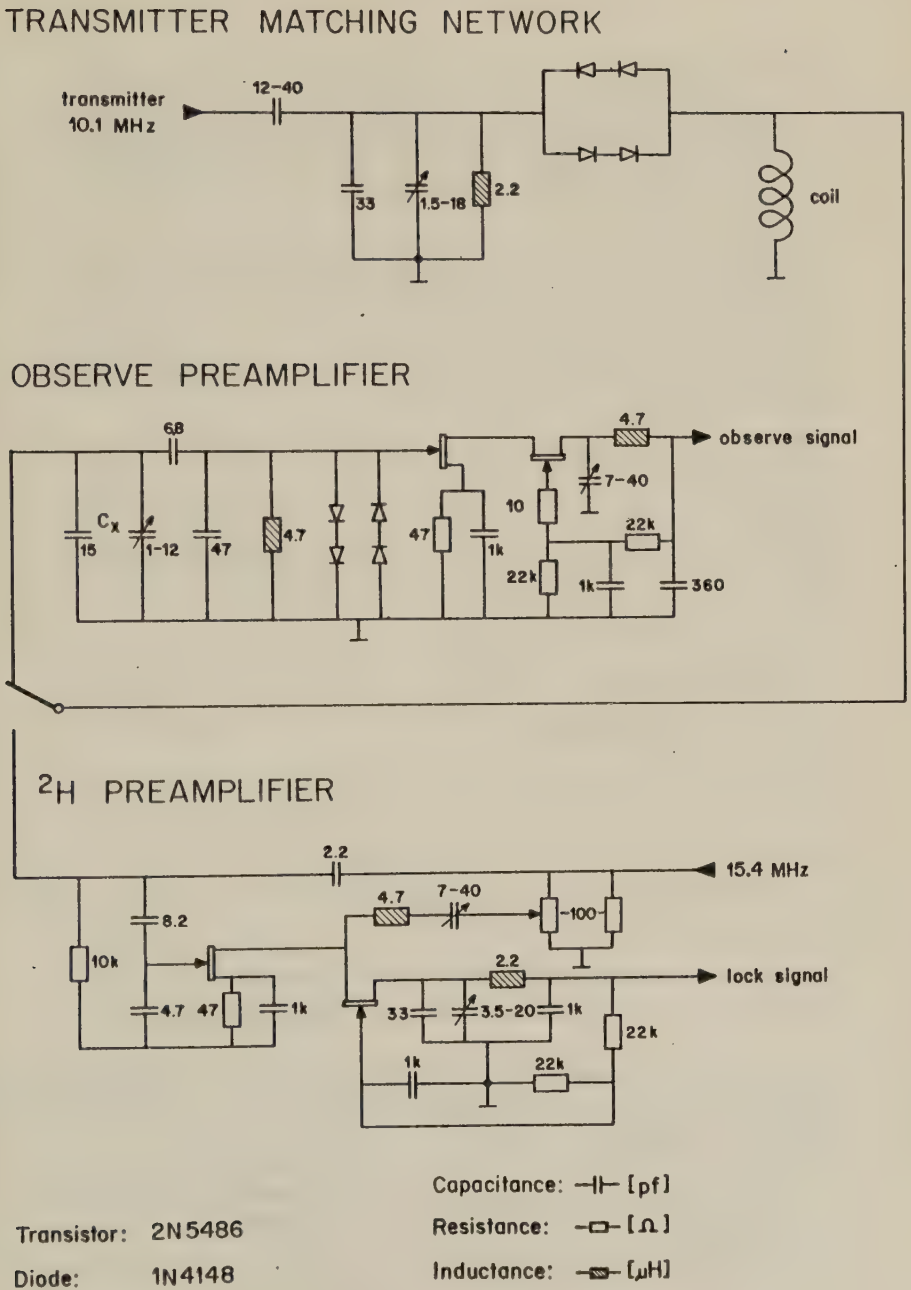
Die Entkopplerspulen, welche bei der ursprünglichen 4415 Probe als Transmitterspulen verwendet werden, sind orthogonal zu der Empfängerspule auf Keramiksockeln montiert. Sie werden über ein weiteres Netzwerk an die Kabelimpedanz angepasst.

Beim externen ^{19}F-Lock handelt es sich um das VARIAN External Lock Accessory, welches ohne Modifikation verwendet werden kann.

Die Detailschemen sind in Fig. 11 zusammengestellt. Die variable Kapazität von C_x bildet zusammen mit der Empfängerspule den Empfängerschwingkreis. C_x kann abgestimmt werden, während sich die Probe im Magneten befindet, sodass die Resonanzfrequenz für jede Substanzprobe abgestimmt werden kann. Das Diodennetzwerk an der Basis des ersten FET soll den Vorverstärker während des Pulses schützen. Die rest-



Figur 10 Blockschema 20 mm Probenkopf



Figur 11 Detailschemen

liche Schaltung entspricht einer Kaskodenanordnung, deren Vorteil im wesentlichen darin besteht, dass sie den Resonanzkreis kaum belastet. Dies wiederum geht über die Kreisgüte direkt in die Gleichung für das S/N-Verhältnis ein.

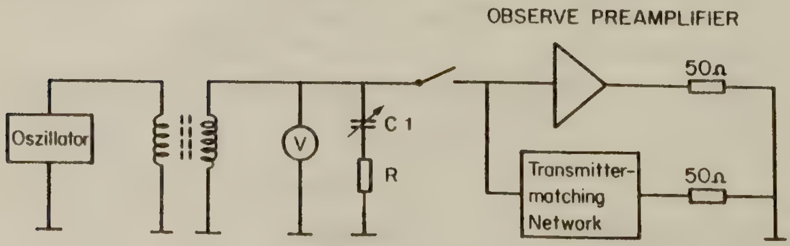
Fakultativ kann an der Stelle des 10,1 MHz auch ein 15,4 MHz Vorverstärker auf die Spule geschaltet werden. Dieser enthält, abgesehen von der Zuleitung des Senders, eine dem 10,1 MHz Vorverstärker analoge Schaltung. Dabei wird in einem RC-Glied das Transmittersignal von der Response der Substanzprobe abgetrennt. Es hatte sich gezeigt, dass bei der vorgegebenen Induktivität der Empfängerspule die Schaltkapazitäten den Schwingkreis bei 15,4 MHz in Resonanz bringen. Da gelegentlich unkontrollierte Oszillationen auftraten, wurde der Schwingkreis mit $R = 10\ k\Omega$ gedämpft.

2.3.4. Resultate

2.3.4.1. Empfängerspule

Die Güte der Empfängerspule wurde sowohl ausserhalb der Probe wie auch nach dem kompletten Einbau bestimmt. Dabei wurde die folgende Prüfschaltung gewählt (Fig. 12):

Figur 12



Der Ausgang eines Oszillators (FLUKE 6160), dessen Frequenz digital eingestellt werden kann, wurde induktiv in den Empfängerschwingkreis eingekoppelt. Die Resonanzfrequenz wurde mit der Trimkapazität C1 auf 10,1 MHz abgestimmt. Die Wechselspannung wurde mit einer HF-Probe abgenommen und auf einem Röhrenvoltmeter (TRIPLETT 850) gemessen. Für verschiedene Werte von R wurden die Resonanzkurven aufgezeichnet. Daraus ergibt sich der Leitungswiderstand R_o nach den folgenden Beziehungen:

$$R_o = \frac{R(1) - R(2)\dfrac{\Delta\omega(1)}{\Delta\omega(2)}}{\dfrac{\Delta\omega(1)}{\Delta\omega(2)} - 1} \qquad (36)$$

R(1) und R(2) sind variable Widerstände, $\Delta\omega(1)$ und $\Delta\omega(2)$ die dazugehörigen Halbwertsbreiten der Resonanzkurven. Die Kreisgüte Q ist

$$Q = \frac{\sqrt{3}}{2}\,\frac{\omega_o}{\Delta\omega} \qquad (R = 0)$$

Die experimentell bestimmten Werte für den 20 mm Silberdrahtinsert waren

a) Ohne Vorverstärker und Transmitteranpassung

$\Delta\omega = 90$ kHz, $Q = 97$

b) Im Probenkopf mit Vorverstärker und Transmitter

$\Delta\omega = 110$ kHz, $Q = 80$

Als Vergleichswert weist der VARIAN 12 mm Insert ein $\Delta\omega$ von 110 kHz mit einem Q von 80 auf (ohne Vorverstärker, Transmitter durch Crossed-Coil-Anordnung ohne Einfluss).

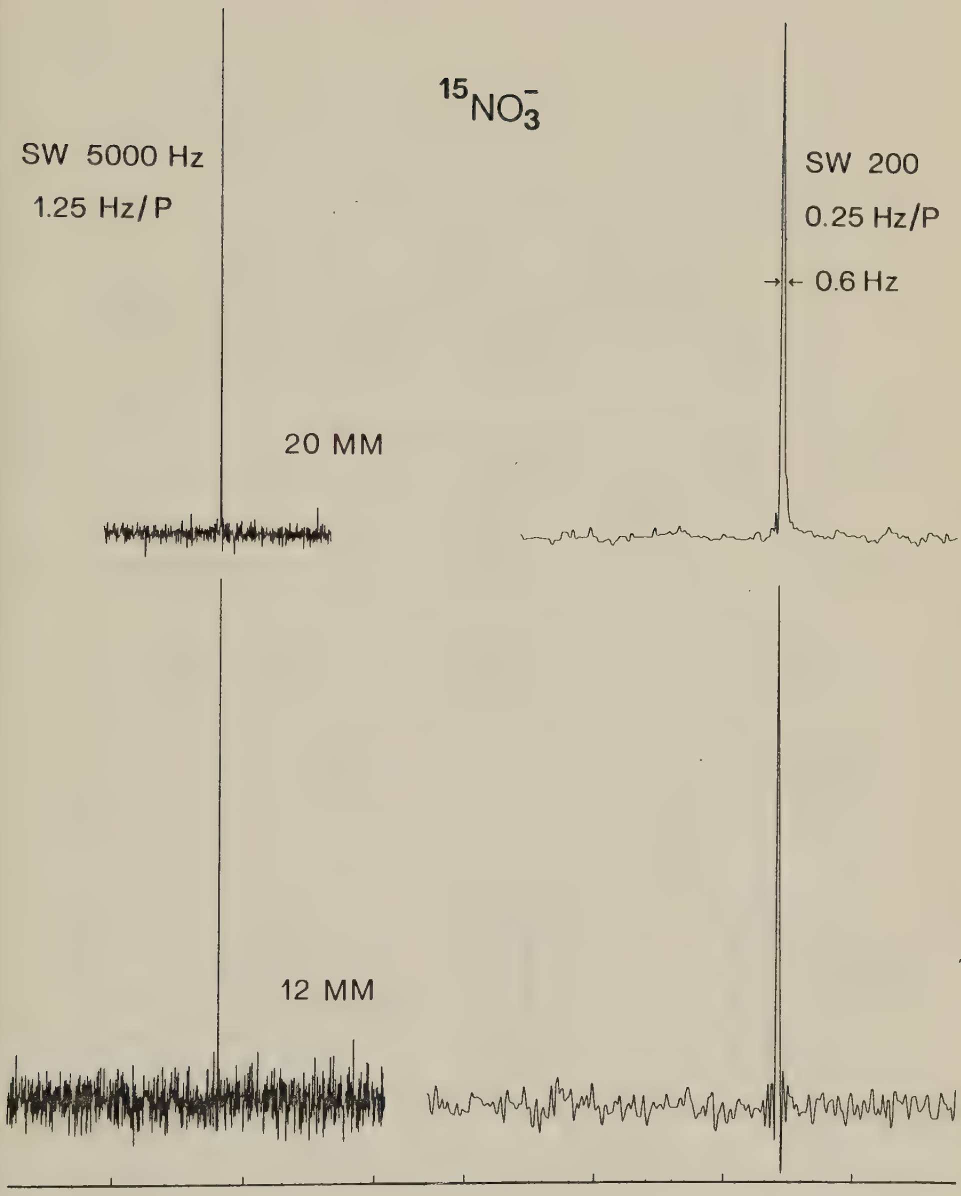
2.3.4.2. Anpassungen

Die optimierten Werte der Bauteile in den Anpassungsnetzwerken sind aus dem Detailschema (Fig. 11) ersichtlich. Bei der mechanischen Auslegung wurde darauf geachtet, dass alle Trimelemente an der betriebsbereiten Probe abgestimmt werden können. Dies gilt im besonderen Mass für C_x des Empfängerschwingkreises sowie für die Kapazitäten des Entkopplernetzwerkes, deren optimale Werte bei verschiedenen Lösungsmitteln signifikant variieren.

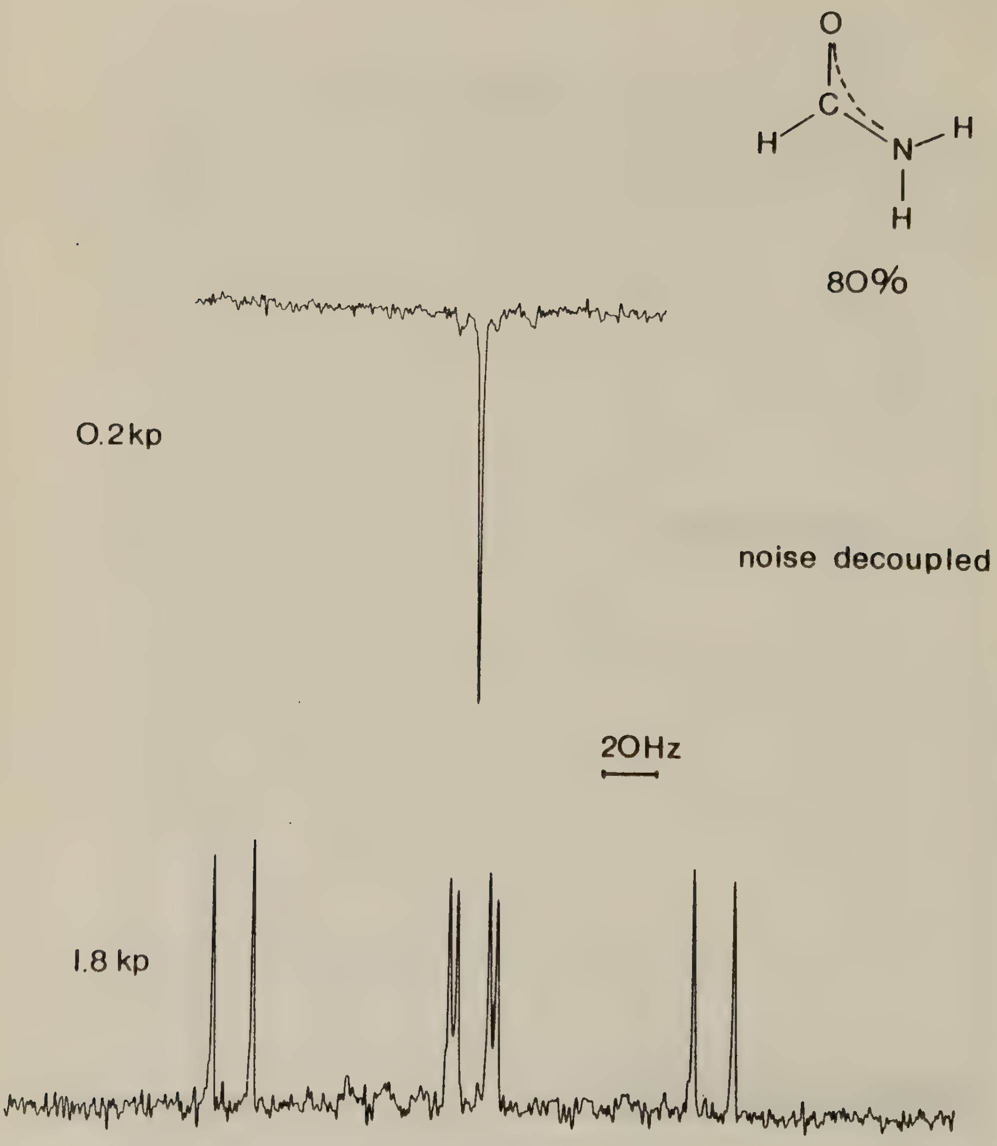
2.3.4.3. Testspektren

Fig. 13 dokumentiert den erreichten S/N-Gewinn sowie die gute Auflösung der 20 mm Probe. Alle Spektren wurden von der gleichen Probelösung erhalten. Beim Umbau vom 12 mm auf den 20 mm Probenkopf wurden lediglich die Feldgradienten optimiert und die unterschiedliche Dauer des 90^o-Pulses berücksichtigt. Die Spektren auf der linken Seite wurden mit einer spektralen Weite von 5000 Hz aufgezeichnet, entsprechend einer digitalen Auflösung von 1,25 Datenpunkten pro Hz. Der Abstand des Signals von der Carrierfrequenz betrug 4500 Hz. Die Spektren auf der rechten Seite (spektrale Weite 200 Hz entsprechend 0,25 Punkte pro Hz) zeigen, dass die Linienbreiten vergleichbar sind.

Fig. 14 zeigt das rauschentkoppelte (oben) und protonengekoppelte (unten) Spektrum von Formamid. Die Linienbreite des entkoppelten Spektrums ist nicht wesentlich grösser als diejenige der ungestörten Signale. Im gekoppelten Spektrum treten drei unterschiedliche Aufspaltungen auf, eine Folge der gehinderten Rotation um die Amidbindung. Die Signale des entkoppelten Spektrums sind gegenüber dem gekoppelten durch NOE invertiert.



Figur 13 Empfindlichkeits- und Linienform-Vergleich zwischen 12 mm und 20 mm Probenkopf



Figur 14 Rauschentkoppeltes und gekoppeltes Spektrum von Formamid

3. Anwendungsbeispiele

Der Anwendungsbereich der ^{15}N-Spektroskopie hat sich in den letzten Jahren deutlich verschoben: waren frühere Arbeiten aus Empfindlichkeitsgründen fast ausschliesslich auf angereicherte Proben beschränkt, so hat sich in neuerer Zeit das Interesse auf Messungen in der natürlichen Häufigkeit verlagert. Markierungsexperimente beschränken sich weitgehend auf Problemstellungen, die auch in der ^{13}C-Spektroskopie eine Anreicherung des Isotopen verlangen. Es sind dies:

a) Messungen von Kopplungen mit einem andern seltenen Isotopen (^{15}N,^{13}C-; ^{15}N,^{15}N-Kopplungskonstanten).

b) Mechanistische Studien, wobei das Schicksal eines bestimmten N-Atomes im Verlaufe einer Reaktion verfolgt werden soll.

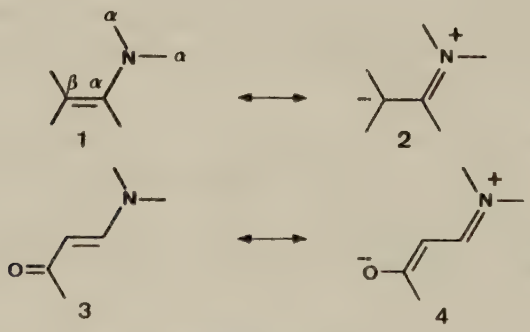
c) Studien an biologischen Systemen, wenn die interessierende Verbindung nur in kleinsten Konzentrationen auftritt.

d) Relaxationszeiten. Für Kerne mit sehr langen Relaxationszeiten wird durch lange Pulsintervalle zur Erreichung des Gleichgewichtes die Messzeit oft ungebührend lang.

Arbeiten mit der natürlichen Häufigkeit des Isotopen liefern in erster Linie chemische Verschiebungen und N,H-Kopplungskonstanten. Daraus lässt sich Information über die elektronische Struktur sowie Nachbarschaftsverhältnisse gewinnen. Durch die hohe Empfindlichkeit der chemischen Verschiebung gegenüber Hybridisierungsänderungen lassen sich Tautomerieverhältnisse, Protonierungsstellen etc. abklären.

3.1. ^{15}N-NMR-Untersuchungen an Enaminen und Enaminoketonen

Die besondere Reaktivität der Enamine gegenüber elektrophilen Reagentien beruht auf der Wechselwirkung des freien Stickstoffelektronenpaares mit der benachbarten Doppelbindung. Dies kann in einer Resonanzhybridformulierung veranschaulicht werden (Fig. 15)



Figur 15

Durch die Erhöhung der Elektronendichte am olefinischen β-Kohlenstoffatom wird diese Position einer Substitution durch eine Vielfalt elektrophiler Reagentien zugänglich [43]. Das Ausmass der Polarisierung und damit der Anteil der Iminiumstruktur (2) (Fig. 15) am Resonanzhybrid hängt sowohl von der Olefin- wie auch der Aminkomponente ab. Diese variable Elektronendelokalisierung und die sie bestimmenden Einflüsse hat denn auch die Spektroskopiker schon immer interessiert. Befassten sich frühe Arbeiten vorwiegend mit UV- [44] und IR- [45] spektroskopischen Daten, so ist in neuerer Zeit eine ganze Reihe von ^{1}H-und ^{13}C-NMR Untersuchungen erschienen [46-49]. Neben Polarisierungseffekten wurden auch Stereoisomerie- und Konformationseffekte untersucht [49]. Als Mass für die Elektronendelokalisierung wurden die chemischen Verschiebungen des olefinischen β-C-Atoms oder des (wenn vorhanden) daran gebundenen Protons gewertet. Besonders die Interpretation

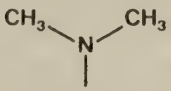
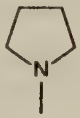
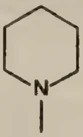
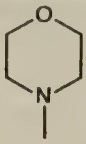
der ^{13}C-Daten erwies sich als kontrovers, da sterische Einflüsse von Substituenten am Olefin- wie am Stickstoffteil von vergleichbarer Grösse sind wie die durch Elektronendelokalisierung induzierten Verschiebungen [45].

^{15}N-chemische Verschiebungen sollten grundsätzlich ebenfalls Aufschluss über n-π-Wechselwirkungen geben. Aus diesem Grund haben wir uns entschlossen, die ^{15}N-Spektren einer Reihe von Enaminen aufzunehmen. Mit in die Betrachtungen einbezogen haben wir konjugierte Enamine und Enaminoketone (vinyloge Amide), weil dafür eine verstärkte Polarisierung zu erwarten war (Fig. 15 (3), (4)).

3.1.1. Chemische Verschiebungen

Wir haben die ^{15}N-chemischen Verschiebungsdaten in drei Gruppen eingeteilt: Werte für typische Enamine (cyklische und offenkettige), solche mit erweiterter Konjugation und Enaminoketone. Die Aminokomponente haben wir über die typischen Vertreter Dimethylamino, Pyrrolidino, Piperidino und Morpholino variiert. Die chemischen Verschiebungen der Gruppe I, relativ zu externem Nitrat, sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Sie liegen zwischen -348 und -303 ppm. Mit eingeschlossen in der Tabelle sind die Werte für die korrespondierenden sekundären und tertiären Amine, deren Absorptionsbereich zwischen -369 und -312 ppm liegt.

Tabelle 2 ^{15}N chemische Verschiebungen [δ, ppm] von typischen Enaminen R-X und verwandten Aminen R-X

R \ X					
Cyclohex-1-enyl	-330,1 1	-303,0 2	-303,6 3	-308,4 4	-314,2 5
Cyclopent-1-enyl	-331,4 6	-306,7 7	-307,2 8	-311,6 9	-
$(CH_3)_2C{=}CH$-	-347,5 10	-318,5 11	-321,9 12	-326,4 13	-
H-	-368,5[a] 36	-339,8 37	-339,5 38	-346,4 39	-
CH_3-	-362,8[b] 40	-335,8 41	-339,8 42	-344,0 43	-
$CH_3CH_2CH_2$-	-354,5 44	-325,4 45	-329,7 46	-333,8 47	-
Cyclohexyl	-348,4 48	-314,9 49	-323,4 50	-326,5 51	
Cyclopentyl	-342,1[c] 52	-312,2 53	-317,2 54	-320,8[c] 55	-
$(CH_3)_2CH{-}CH_2$-	-355,2[c] 56	-326,1 57	-330,4[c] 58	-335,0 59	-
$(C_6H_5)_2CH{-}CH_2$-	-355,8[c] 60	-326,6[c] 61	-330,9[c] 62	-335,2 63	-

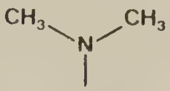
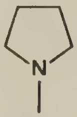
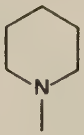
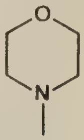
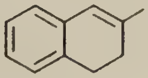
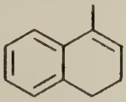
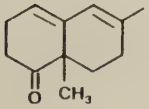
a) Gemessen bei 4°

b) Daten von [2]

c) Berechnete Werte

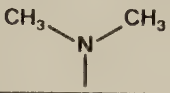
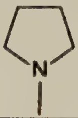
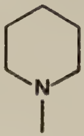
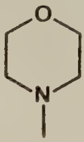
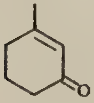
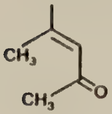
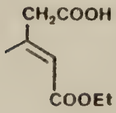
Die Daten für konjugierte Enamine finden sich in Tabelle 3.

Tabelle 3 ^{15}N chem. Verschiebungen [δ, ppm] von konjugierten Enaminen

R \ X				
(E)-C_6H_5-CH=CH-	-323,1 14	-297,4 15	-299,9 16	-306,1 17
$(C_6H_5)_2$C=CH-	-325,6 18	-298,2 19	-301,3 20	-309,2 21
	-323,2 22	-	-	-
	-309,3 23	-	-	-
	-	-297,5 24	-	-

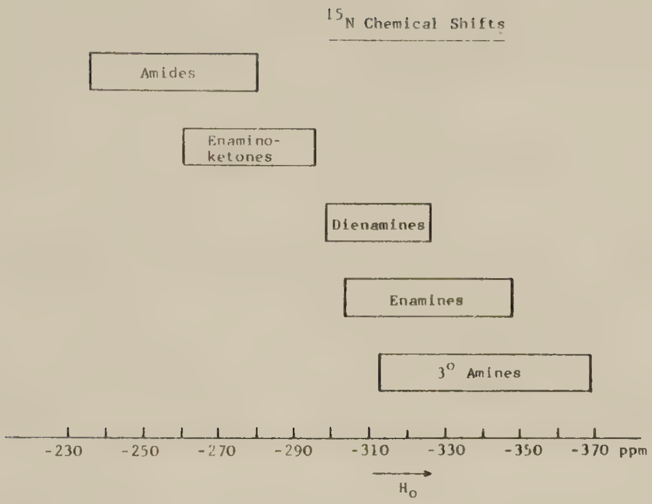
Die gefundenen Werte von -326 bis -298 ppm zeigen, dass die entsprechenden N-Atome stärker entschirmt sind. Dieser Effekt wird in Molekülen, deren Olefinteil stark elektronenziehend ist, weiter verstärkt; so bei Enaminoketonen, -estern und -nitrilen (Tab. 4). Die chemischen Verschiebungen liegen hier zwischen -295 und -260 ppm, wobei sie sich deutlich in den Bereich der Amidabsorptionen (-280 bis -235 ppm) schieben.

Tabelle 4 ^{15}N chem. Verschiebungen [δ, ppm] von Enaminoketonen und verwandten Verbindungen

R	X				
					$-NH(CH_2)_3CH_3$
	-295,3 25	-270,9 26	-276,7 27	-288,0 28	-
	-294,2 29	-269,2 30	-273,1 31	-280,9 32	-
	-270,9 33	-	-	-	-
$(CN)_2C{=}C(CN)-$	-	-	-	-	-259,8 34
(E)-NO_2-CH=CH-	-	-	-263,0 35	-	-

3.1.2. Diskussion

Es soll versucht werden, die beobachteten chemischen Verschiebungen auf dem Hintergrund von Elektronendelokalisierung und Substituenteneffekten zu diskutieren. Fig. 16 zeigt die Bereiche ^{15}N chemischer Verschiebungen für Amine, Enamine, Enaminoketone und Amide.

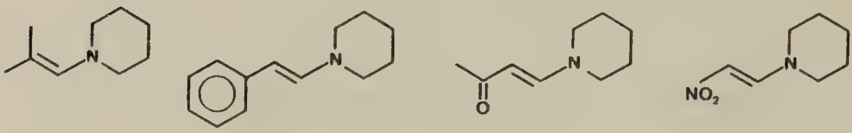


Figur 16

Obwohl die Gesamtvariation der chemischen Verschiebungen (ohne Amide) über 100 ppm beträgt, ist sie innerhalb der Gruppen beträchtlich kleiner. Zudem existieren weite Ueberlappungsgebiete nicht nur zwischen den Enaminen, Dienaminen und Aminoketonen, sondern auch zwischen Enaminen und tertiären Aminen sowie Enaminoketonen und Amiden. Vergleicht man indessen die Verschiebungen von Enaminen mit den durch Hydrierung daraus gewonnenen tertiären Aminen, so findet man in allen von uns untersuchten Fällen die Resonanz des Enamins bei höheren Frequenzen. Innerhalb einer Serie von Enaminen mit gleicher Amin-Komponente

verläuft die Hochfrequenzverschiebung des ^{15}N-Signals ebenfalls parallel zu der aus chemischer Erfahrung gemachten Delokalisationsabstufung (Fig. 17).

Figur 17



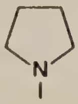
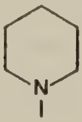
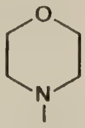
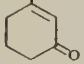
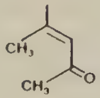
-321,9 -299,9 -273,1 -263,0

Verschiebung nach höheren Frequenzen

Steigt also der Anteil der Iminiumstruktur am Resonanzhybrid, so wird auch die chemische Verschiebung des Stickstoffes 'iminiumähnlicher', d.h. gegenüber Aminen zu höheren Frequenzen verschoben. Dies ist nicht selbstverständlich, denn eine Erniedrigung der Elektronendichte an einem N-Atom ist nicht notwendigerweise auch mit einer Verschiebung nach höheren Frequenzen identisch, wie das in der ^{1}H-und ^{13}C-Spektroskopie die Regel ist. Ein direkter Vergleich der chemischen Verschiebungen von Enaminen mit unterschiedlicher Aminokomponente ist nicht möglich. Studien an aliphatischen Aminen [50] haben gezeigt, dass α-(-8,7 ppm) und β-(-18,2 ppm) Substituentenkonstanten von der gleichen Grössenordnung sind wie die von uns beobachteten Polarisationseffekte. Wir sind daher dazu

übergegangen, sogenannte differentielle chemische Verschiebungen ($\Delta\delta$(N)) zu definieren. Diese erhält man durch Subtraktion der Werte der Enamine von denen der korrespondierenden tertiären Amine. Sterische und induktive Komponenten von unterschiedlicher N-Substitution sollten sich auf diese Weise weitgehend aufheben, sodass die verbleibende differentielle Verschiebung lediglich noch die unterschiedlichen Bindungsordnungen widerspiegeln sollten. Es hat sich weiter gezeigt, dass die Herstellung des exakt entsprechenden Amins nicht einmal notwendig ist, weil die Substituentenkonstanten additiv sind. So können die chemischen Verschiebungen der Amine in einer Zeile von Tab. 2 aus der experimentell bestimmten Verschiebung einer Verbindung und den bekannten Inkrementen zwischen Dimethyl-, Amino-, Pyrrolidino-, Piperidino- und Morpholinoderivaten abgeleitet werden. Die Inkremente selbst wurden aus den vollständigen experimentellen Serien der N-Methyl- und N-Propylamine abgeleitet. Die $\Delta\delta$-Werte der Verbindungen aus Tabellen 2-4 sind in Tabelle 5 wiedergegeben.

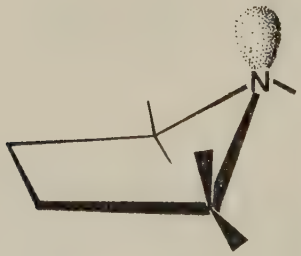
Tabelle 5 Differentielle chem. Verschiebungen $\Delta\delta$(N)[a)]

R \ X				
Cyclohex-1-enyl	-18,3	-11,9	-19,8	-18,1
Cyclopent-1-enyl	-10,7[b)]	- 5,5	-10,0	- 9,2[b)]
$(CH_3)_2C$=CH-	- 7,7[b)]	- 7,6	- 8,5[b)]	- 8,6
(E)-C_6H_5-CH=CH-	-32,1	-28,7	-30,5	-28,9
$(C_6H_5)_2C$=CH-	-30,2[b)]	-28,4[b)]	-29,6[b)]	-26,0
	-53,1	-44,0	-46,7	-38,5
	-54,2[b)]	-45,7[b)]	-50,3[b)]	-45,6
(E)-NO_2-CH=CH-			-66,7	

a) $\Delta\delta(N) = \delta_N(\text{Amin}) - \delta_N(\text{Enamin})$ b) Aus berechneten Werten

Konjugierte Enamine weisen erwartungsgemäss grössere Differenzen auf als nicht-konjugierte; das gleiche gilt für die 'Push-Pull-Systeme' der Enaminoketone oder der Nitroverbindung (35) in noch verstärktem Mass. Vergleicht man nun die differentiellen chemischen Verschiebungen innerhalb einer Reihe mit gleicher Olefinkomponente aber unterschiedlichem Aminteil, so findet man eine ähnliche Abstufung wie man sie von der chemischen Reaktivität her gewohnt ist, mit Ausnahme der Werte für die Pyrrolidinoderivate. Diese sind für alle untersuchten Verbindungen kleiner als erwartet. Eine mögliche Erklärung bietet die Betrachtung der Stereomodelle. In Pyrrolidin liegen zwei der α-H-Atome parallel zum freien Stickstoffelektronenpaar (Fig. 18).

Figur 18



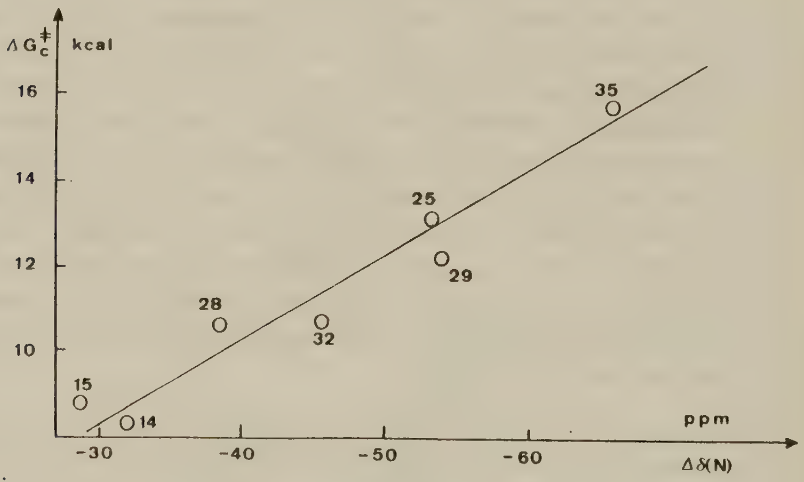
Dies verhilft den beiden Bindungen zu einem partiellen Doppelbindungscharakter. Die Situation beim Uebergang Amin-Enamin kann nicht-klassisch wie in Fig. 19 geschrieben werden.

Figur 19

Dadurch wird natürlich die Differenz zum Enamin, wo das N ebenfalls sp^2-ähnlich vorliegt, geringer. Diese Hypothese wird gestützt durch einen Vergleich zwischen Pyrrolidin und Diäthylamin; obwohl beide die gleiche Anzahl α- und ß-Substituenten aufweisen, liegt die Resonanz von Pyrrolidin 13 ppm nach tiefem Feld verschoben. Dies ist ein Vielfaches der Standardabweichung für Substituentenkonstanten für sekundäre Amine [50].

Wir haben versucht, die Brauchbarkeit differentieller chemischer Verschiebungen für die Beurteilung von n,π-Wechselwirkungen durch unabhängige Experimente abzustützen. Eine Messgrösse, die im wesentlichen ebenfalls von der π-Bindungsordnung abhängt, ist die Barriere für die Rotation um die formale N-C(α)-Einfachbindung. Die freie Aktivierungsenthalpie bei der Koaleszenztemperatur der C(α')-^{13}C-Signale wurde für die Verbindungen 14, 15, 25, 28, 29, 32 und 35 bestimmt. Es handelt sich dabei ausschliesslich um konjugierte Enamine, weil für die andern eine Bestimmung von $\Delta G_c^{\neq}$ aus experimentellen Gründen nicht möglich war. Zu beachten ist, dass $\Delta G_c^{\neq}$ über den Entropieterm temperaturabhängig ist. Dies fällt dann nicht ins Gewicht, wenn $\Delta S^{\neq}$ klein ist. Fig. 20 zeigt eine befriedigend lineare Abhängigkeit von $\Delta G_c^{\neq}$ und $\Delta\delta(N)$. Die Regres-

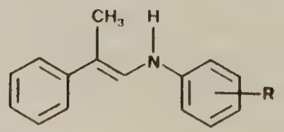
sionsanalyse liefert $\Delta G_c^{\neq}$ [kcal/Mol]= -0,19(Δδ(N)[ppm])+ 2,91 mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,94. In ähnlicher Weise haben Martin et al.[51] Arrhenius-Aktivierungsenergien E_a mit ^{15}N-chemischen Verschiebungen von Amiden und Thioamiden korreliert. Dabei konnten sie durch semi-empirische Rechnungen die Gültigkeit derartiger Korrelationen nachweisen.



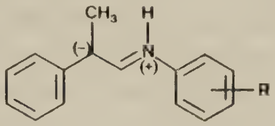
Figur 20 Korrelation der freien Aktivierungsenthalpie $\Delta G^{\neq}$ für die Rotation um die N-C(α)-Bindung mit den differentiellen chemischen Verschiebungen Δδ(N)

Eine weitere unabhängige Bestätigung für die Anwendbarkeit differentieller chemischer Verschiebungen haben wir aus den Daten einer Serie von Anilinostyrolen der in Fig. 21 dargestellten Struktur erhalten.

Figur 21



Das freie Elektronenpaar des Stickstoffs ist sowohl am Enamin- wie auch am Anilin-π-System beteiligt. Das Ausmass der n,π-Wechselwirkung sollte durch R beeinflusst werden, da Resonanzstrukturen von der Form



durch solche Reste R stabilisiert werden, welche die Ladungsdichte an C(1) des Anilinbenzolringes erhöhen. Demzufolge wird eine Abhängigkeit von Δδ(N) von Hammett'schen Substituentenkonstanten erwartet. Innerhalb einer geschlossenen Serie, bei der R nur in meta- oder para-Stellung sitzt, müssen auch die chemischen Verschiebungen des olefinischen β-C-Atoms Mass für die Polarisierung sein.[a] Die Resultate dieser Studie sind in Tab. 6 zusammengefasst.

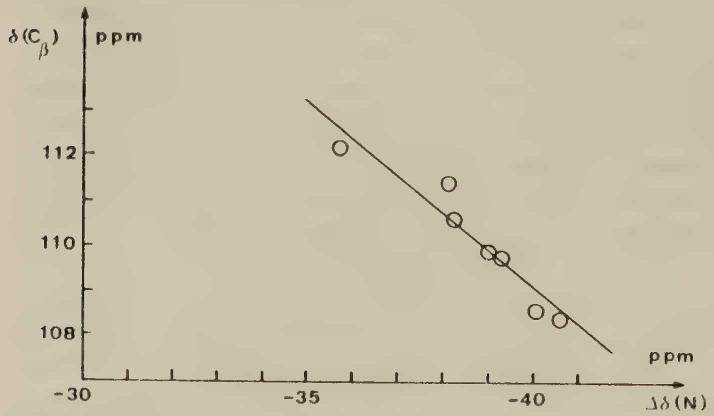
Tabelle 6

R	δ(N)	$^1J(N,H)$	$\delta(N)_{Anilin}$	Δδ(N)	σ	$\delta(C_\beta)$
$p-NO_2$	-269,4	90,4	-300,1	-30,7	0,78	112,4
$m-NO_2$	-278,2	92,3	-313,9	-35,7	0,71	112,2
m-Cl	-279,5	91,7	-317,6	-38,1	0,37	111,4
p-Cl	-280,6	91,2	-318,8	-38,2	0,24	110,6
$m-OCH_3$	-279,5	90,6	-318,5	-39,0	0,08	109,9
H	-280,1	90,8	-319,4	-39,3	0	109,8
$p-OCH_3$	-284,2	92,9	-324,8	-40,6	-0,11	108,4
$p-CH_3$	-281,4	90,2	-321,5	-40,1	-0,13	108,6

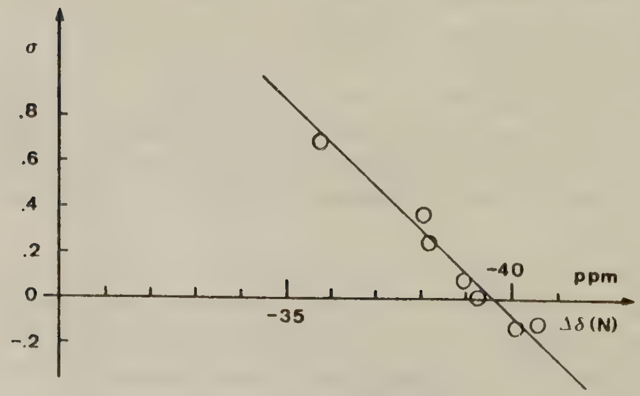
Lösungsmittel: Dimethylsulfoxid-d_6

[a] Dies ist, wie Bedford et al.[45] feststellten, generell nicht der Fall, weil der Einfluss unterschiedlicher sterischerWechselwirkungen nur schwer abzuschätzen ist.

Auffällig ist, dass die direkten N,H-Kopplungskonstanten innerhalb der Serie nur unwesentlich und unsystematisch variieren. Sie zeigen typische Werte für sp^2-Hybridisierung [19]. Die differentiellen chemischen Verschiebungen zeigen wiederum die erwartete lineare Abhängigkeit sowohl von den Hammet-Parametern wie auch von den ^{13}C-Verschiebungen der olefinischen ß-C-Atome (Fig. 22, 23).



Figur 22 Korrelation von differentiellen chemischen Verschiebungen (ΔδN) mit der chemischen Verschiebung von C(ß)-in substituierten Anilinostyrolen



Figur 23 Korrelation differentieller chemischer Verschiebungen mit Hammett σ-Werten für substituierte Anilinostyrole

Eine unabhängige ^{15}N-Studie über Enamine und Enaminoketone wurde praktisch gleichzeitig mit der unsrigen veröffentlicht [52][53]. Die Aminkomponente wurde ebenfalls über die Reihe Pyrrolidin, Piperidin und Morpholin sowie zusätzlich Azacycloheptan variiert. Anstelle der Dimethylamino- wurden Diaethylamino-Derivate als Vertreter offenkettiger Basen eingesetzt. Die Olefinkomponenten beschränkten sich auf cyclische Systeme. Das Prinzip der differentiellen chemischen Verschiebungen wurde zwar nicht diskutiert, bei der Interpretation der Daten jedoch ebenfalls verwendet. Interessant ist der Vergleich der Pyrrolidino- mit den korrespondierenden Diaethylamino-Verbindungen. Die chemischen Verschiebungen von 1-Pyrrolidino- und 1-Diaethylamino-Cyclopenten sind annähernd gleich (ähnliche Substituenteninkremente). Dagegen sind die $\Delta\delta$(N)-Werte, verursacht durch die unterschiedlichen Aminverschiebungen, um 12,9 ppm verschieden. Dies zeigt, dass die auf S. 61 tabellierten $\Delta\delta$(N)-Werte für Pyrrolidin um 13 ppm korrigiert werden könnten (vgl. S. 64).

Gerade in Zusammenhang mit dem Studium einer synthetisch wichtigen Substanzklasse stellt sich die Frage nach der Abhängigkeit von Reaktivität und spektroskopischen Grössen. Hier gilt für die ^{15}N-Spektroskopie das gleiche Diktum wie für die ^{1}H- und ^{13}C-Resonanz: Obwohl trendmässig Aussagen möglich sind, besteht keine feste Beziehung zwischen kinetischen und spektroskopischen Parametern. Während NMR Parameter im wesentlichen durch die Konfiguration und Konformation des Grundzustandes bestimmt werden, entscheidet für das kinetische Verhalten allein der Uebergangszustand. Je edukt-ähnlicher dieser ist, desto enger wird die Beziehung zu den spektroskopischen Grössen sein.

3.1.3. Experimentelles

Die ^{15}N-NMR Spektren wurden in natürlicher Isotopenhäufigkeit auf einem VARIAN XL-100-15 Spektrometer (12 mm Röhr-

chen) bei 10,1 MHz gemessen. Sofern nicht anders spezifiziert, handelt es sich bei den Messproben um benzolische Lösungen (80% v/v). In Fällen langer Relaxationszeiten oder ungünstiger NOE's wurde als Relaxationsreagens Chromacetylacetonat ($Cr(Acac)_3$) in Konzentrationen bis 0,1 M zugefügt. Effekte auf die chemische Verschiebung durch das Relaxationsreagens oder durch Aenderungen in der Substratkonzentration waren in allen beobachteten Fällen kleiner als $\pm$ 0,5 ppm. Die chemischen Verschiebungen beziehen sich auf externes Nitrat (31,3 mg $NH_4{}^{15}NO_3$ pro ml H_2O).

Die temperaturabhängigen ^{13}C-NMR-Spektren wurden auf einem VARIAN XL-100-12 Spektrometer bei 25,2 MHz gemessen (10 mm Probenröhrchen). Die Probentemperaturen ($\pm$ 2^o) wurden mit Hilfe eines Präzisionsthermometers in einem Referenzröhrchen mit gleichem Lösungsmittel erhalten. Die Substratkonzentrationen betrugen (40 $\pm$ 10) % v/v in Aceton-d_6 oder Methylenchlorid-d_2. Die freien Aktivierungsenthalpien wurden aus den Austauschraten beim Koaleszenzpunkt mit Hilfe der Eyring-Gleichung bestimmt.

Die Mehrheit der beschriebenen Verbindungen wurden nach Standardvorschriften hergestellt. Die Enamine 1-9, 22 und 24 wurden uns in grosszügiger Weise von Prof. U.K. Pandit, Amsterdam, die Amine 44 bis 47 von Dr. P. Fischer, Stuttgart, zur Verfügung gestellt.

3.2. Pterine, Folsäure und deren Dihydro- und Tetrahydroderivate

3.2.1. Einleitung

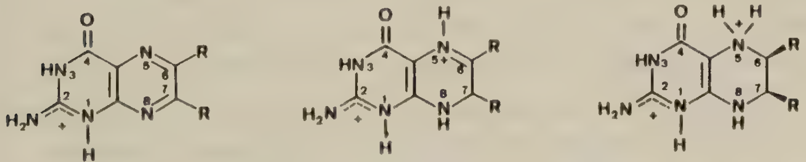
^1H-und ^{13}C-NMR Spektroskopie wurden mehrfach bei Strukturermittlung und Konformationsanalyse von Pterinen, Folsäure sowie ihrer Dihydro- und Tetrahydroderivate eingesetzt [54][55][56]. Eine Ergänzung dieses Datenmaterials durch

Resultate aus ^{15}N-NMR-spektroskopischen Untersuchungen sollte weitere Information über die Strukturen dieser Verbindungen in Lösung erbringen; dies erscheint besonders darum von Interesse, weil den Stickstoffatomen in den chemischen Reaktionen der biologisch aktiven Pterinderivate eine zentrale Rolle zukommt.

Die Löslichkeit vieler Pterinderivate ist beschränkt. Zudem lässt die Instabilität, besonders der Tetrahydro-Formen, nicht beliebig lange Messzeiten zu. Vorversuche hatten denn auch gezeigt, dass mit der kommerziell erhältlichen Ausrüstung eine derartige Studie nicht möglich war. Erst mit Hilfe der in Kap. II/2 beschriebenen instrumentellen Verbesserungen liessen sich 0,5-0,7 molare Lösungen protonierter Spezies innerhalb von 2-6 Stunden vermessen. Die Aufnahmedauer erhöhte sich für die unprotonierten Pyrazinstickstoffatome der Folsäure (ca. 0,5 M) auf 20 Stunden.

3.2.2. Experimentelle Resultate [63]

Die Strukturen der protonierten Verbindungen (Fig. 24) sind durch ^{1}H-und ^{13}C-NMR Daten [54][56a,b] und pK_s-Messungen [57] belegt. Zudem liegen röntgenkristallographische Untersuchungen einiger Hydrochloride vor [58][59].



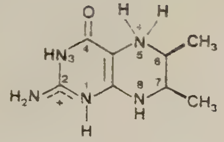
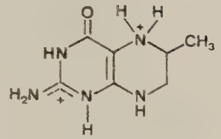
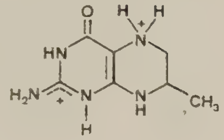
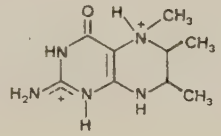
Figur 24 Strukturen der protonierten Pterine, Dihydro- und Tetrahydropterine

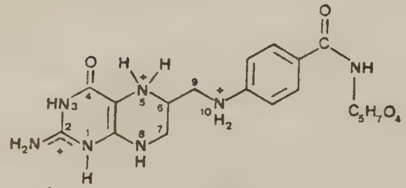
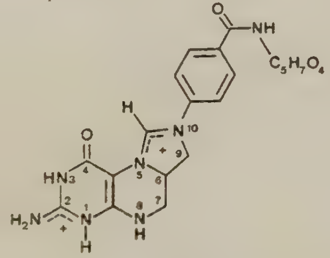
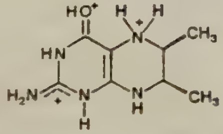
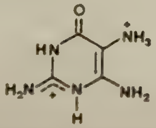
Erwartungsgemäss unterliegen die an Stickstoff gebundenen Protonen einem raschen Austausch mit den Lösungsmittelprotonen. In aprotischen Lösungsmitteln wie DMSO wurde bei den für die Aufnahme notwendigen Konzentrationen ebenfalls rascher intermolekularer Austausch festgestellt. Zuordnungstechniken, welche auf ^{15}N,H-Kopplungskonstanten beruhen, sind für unsere Problemstellung daher von vornherein ungeeignet. Wir haben deshalb die Methode des Spektrenvergleichs gewählt. Durch Einführen geeigneter Substituenten, deren Einfluss auf die chemischen Verschiebungen benachbarter Stickstoffatome bekannt ist, kann zwischen einzelnen Resonanzen unterschieden werden. Dabei müssen natürlich Lösungsmitteleffekte - und das heisst in unserm Fall die Protonierungs- und Tautomerieverhältnisse - über die ganze Serie hinweg gleich sein. Trifluoressigsäure (TFA) war Lösungsmittel der Wahl, da sich darin alle für uns interessanten Verbindungen in Konzentrationen $>$0,5 M lösen und über die erforderlichen Messzeiten von 2-6 Stunden stabil sind. Alle Signale der Dihydro- und Tetrahydropterine wiesen NOE bei Protonenentkopplung auf, während die Pyrazinstickstoffatome der Pterine nur mit inversem Entkopplerpulsen entdeckt werden konnten [34]. Die chemischen Verschiebungen, relativ zu externem Nitromethan, finden sich in Tab. 7. Negatives Vorzeichen bedeutet, dass das entsprechende Stickstoffatom bei tieferen Frequenzen zur Resonanz gelangt als der Standard.

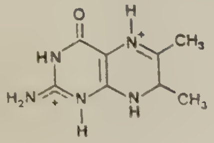
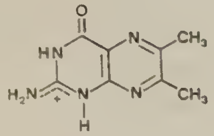
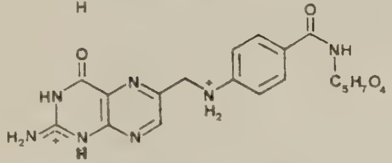
Charakteristische Veränderungen im Spektrum von 6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin wurden für verschiedene Protonierungsstufen beobachtet. Diese Resultate sind in Tab. 8 zusammengestellt.

Ein Beispiel für ein ^{15}N-Pterinspektrum findet sich in Fig. 25.

Tabelle 7. ^{15}N-chem. Verschiebungen[a)] von 5,6,7,8-Tetrahydropterinen, 7,8-Dihydropterinen und Pterinen

Verbindung		N(1)	N(3)	N(5)	N(8)	NH_2	N(10)	Amid	Solvens
	(1)	-269,4	-246,3	-333.2	-287,4	-296,5			TFA
	(2)	-269,0	-246,5	-332,9	-299,6	-297,5			TFA
	(3)	-268,1	-247,7	-346,3	-286,1	-297,3			TFA
	(4)	-270,1	-246,2	-330,6	-288,8	-295,9			TFA

Verbindung		N(1)	N(3)	N(5)	N(8)	NH_2	N(10)	Amid	Solvens
	(5)	-267,7	-242,8	-335,5	-303,6	-295,5	-319,7	-261,4	6N HCl
	(6)	-268,3	-245,5	-251,3[b)]	-300,7	-298,1	-245,5[b)]	-262,1	TFA
	(7)	-263,2[b)]	-257,9[b)]	-337,2	-265,2[b)]	-288,1			FSO_3H
	(8)	-255,8	-242,8	-350,0	-302,9	-298,3			H_2O (Dihydrochlorid)

Verbindung		N(1)	N(3)	N(5)	N(8)	NH_2	N(10)	Amid	Solvens
	(9)	-266,5	-245,6	-194,1	-294,0	-296,3			H_2O (Dihydrochlorid)
	(10)	-262,3	-236,7	- 84,5 b)	- 79,3 b)	-296,7			TFA
	(11)	-264,1	-238,0	- 78,5	- 58,3	-294,8	-325,5	-262,2	TFA

a) δ[ppm] rel. zu ext. CH_3NO_2

b) Zuordnung nicht gesichert

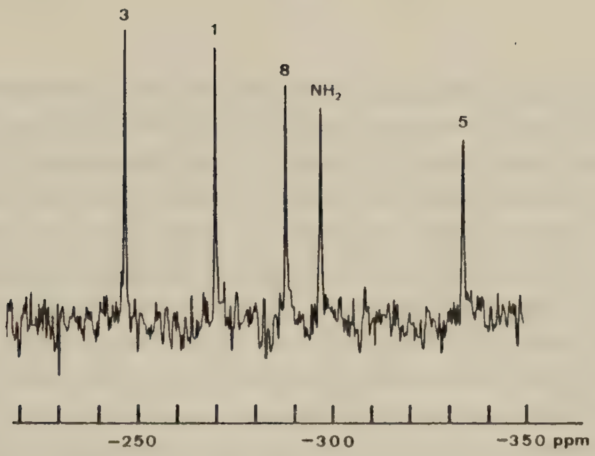
Tabelle 8 ^{15}N-chemische Verschiebungen[a] von 6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin

Spezies	N(1)	N(3)	N(5)	N(8)	NH_2
Monokation in DMSO (Dihydrochlorid + 1 Molaequiv. NaOH)	-227,9	-240,1	-332,1	-288,0	-298,8
Zugabe von					
0,2 Molaequiv. CF_3COOH	-230,5	-240,2	-332,3	-288[b]	-298,5
0,4 Molaequiv. CF_3COOH	-235,5	-239,9	-332,1	-288,3	-297,8
0,6 Molaequiv. CF_3COOH	-238,3	-240,2	-333[b]	-289,2	-297,6
2,0 Molaequiv. CF_3COOH (+ 1 ml H_2O)[c]	-243,3	-240,9	-333,5	-288,1	-298,1
2,0 Molaequiv. CF_3COOH + 1 ml H_2O + 1 ml 6N HCl	-256,7	-240,9	-333,5	-288,6	-296,0
Dihydrochlorid in DMSO	-249,3	-241,0	-332,8	-289,6	-296,7

a) δ[ppm] rel. zu externem CH_3NO_2

b) Verbreitert

c) H_2O aus Löslichkeitsgründen zugefügt



Figur 25 ^{15}N-NMR-Spektrum von 6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin Dikation (1), 0,7 M in TFA, Protonen-rauschentkoppelt, 3500 Pulse

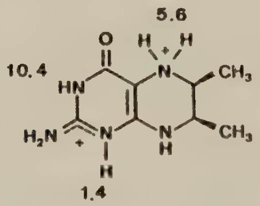
3.2.3. Diskussion

5,6,7,8-Tetrahydropterine

Die Zuordnung der Resonanzlinien von N(5) und N(8) im Spektrum von 6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterindikation (1) basiert auf einem Vergleich mit seinen 6-Methyl-(2) und 7-Methyl-(3)analogen. Die chemischen Verschiebungen der Pyrimidinstickstoffatome (N(1), N(3) und NH_2) werden durch unterschiedliche Alkylsubstituenten am Pyrazinring kaum beeinflusst. Im Gegensatz dazu weisen N(5) und N(8) ausgeprägte β-Substituenteneffekte auf [2]. δ(N(8)) in 6,7-Dimethyltetrahydropterindikation (1) unterscheidet sich von δ(N(8)) in 6-Methyltetrahydropterindikation (2) durch eine Verschiebung von 12,2 ppm nach höheren Frequenzen. Ein vergleichbarer β-Substituenteneffekt (13,1 ppm) tritt für N(5) zwischen 6,7-Dimethyltetrahydropterindikation (1) und dem 7-Methylanalogen (3) auf. Die entsprechenden

γ-Substituenteninkremente sind vergleichsweise klein (1,3 resp. 0,3 ppm). Von den drei verbleibenden Resonanzen des Pyrimidinteils liegt diejenige der NH_2 Gruppe an C(2) bei tiefsten Frequenzen. Der Wert von rund -296 ppm reproduziert sich innerhalb von 2 ppm in all den Fällen, bei denen der Pyrimidinring in der in Fig. 24 angegebenen tautomeren Form vorliegt. Zudem entspricht er dem Wert der ähnlichen NH_2-Gruppierung in Guanosin, welcher in einem DMSO/TFA Gemisch ebenfalls 296,8 ppm beträgt [60]. Eine Unterscheidung zwischen N(1) und N(3) wurde aufgrund des Protonierungsverhaltens von 6,7-Dimethyl-5,6,7,8-tetrahydropterin möglich. Die pK_s-Werte der einzelnen Gruppen sind in Fig. 26 dargestellt [57].

Figur 26



Das acideste Wasserstoffatom ist an N(1) gebunden. Addition von einem Moläquivalent NaOH führt daher zur Bildung der N(5)-monoprotonierten Spezies. Dies zeigt sich auch in den Veränderungen, die das ^{15}N-Spektrum von (1) erfährt, wenn als Lösungsmittel DMSO mit einem Moläquivalent NaOH anstelle von TFA verwendet wird (Tab. 8): Die Positionen von vier Linien bleiben nahezu unverändert, während eine Resonanzlinie eine Hochfrequenzverschiebung von annähernd 40 ppm erleidet. Aufgrund der pK_s-Werte muss es sich dabei um die Resonanz von N(1) handeln. Schrittweises Zufügen von TFA in Portionen von 20 Mol % hat zur

Folge, dass dieses Signal wieder nach tieferen Frequenzen zurückverschoben wird. Säurekonzentrationen von 200 Mol % und höher konnten nur durch Zugabe von wässriger Salzsäure erreicht werden, da das gebildete Dikation in einem DMSO/TFA-Gemisch nicht mehr in ausreichender Konzentration löslich war. In einem Solvensgemisch DMSO/TFA/6N HCl = 6/1/1 lag die Linienposition von N(1) zwischen den Werten, wie sie in reinem DMSO und reiner TFA bestimmt wurden. Interessant ist, dass die chemischen Verschiebungen von N(1) in DMSO und TFA Lösung nicht identisch sind, obwohl in beiden Fällen das Dikation vorliegen sollte. Es ist indessen denkbar, dass in DMSO ein Teil der Moleküle als Monokation vorliegt, sodass ein Gemisch von Mono- und Dikation in schnellem prototropem Gleichgewicht vermessen wird.

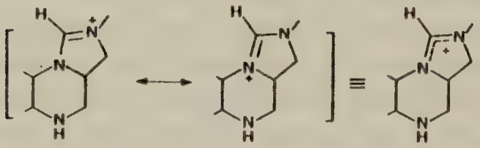
α-Methylsubstitution ist für protonierte Spezies im allgemeinen kein verlässliches Zuordnungskriterium. Das entsprechende Substituenteninkrement, welches für neutrale Amine immerhin 8 ppm beträgt [2], verringert sich bei Protonierung auf 2-3 ppm und rückt damit in die Grössenordnung von Lösungsmitteleffekten. Dies verdeutlicht ein Vergleich der Spektren von 5,6,7-Trimethyl-(4) und 6,7-Dimethyltetrahydropterindikation (1).

Ausgehend von den zugeordneten Spektren der Verbindungen 1, 2 und 3 bereitet die Analyse des Spektrums von Tetrahydrofolsäure in 6n HCl keine besonderen Schwierigkeiten: die Resonanzen des Pterinteils entsprechen innerhalb von 4 ppm denjenigen von Verbindung 3. Die Amidresonanz hat den typischen Wert von -261,4 ppm, während N(10) des p-Aminobenzoesäureteils bei -319,7 ppm zur Resonanz gelangt.

5,10-Metheno-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure (6) ist wie die Tetrahydrofolsäure selbst biochemisch von grösstem Interesse [61]. Die Stickstoffatome N(5) und N(10) sind Teil eines Imidazoliniumsystems, wie dies in der Resonanzhybrid-

formulierung von Fig. 27 zum Ausdruck kommt.

Figur 27



Lediglich sechs der sieben Stickstoffatome konnten im Spektrum von 6 ausgemacht werden. Es ist unwahrscheinlich, dass die fehlende Linie wegen ungünstigem NOE oder extrem langer Relaxationszeit nicht entdeckt wurde, denn es wurden mehrere Spektren unter verschiedenen Bedingungen aufgezeichnet. Es scheint viel wahrscheinlicher, besonders aus einem Vergleich der Linienintensitäten, dass die fehlende Resonanzlinie mit derjenigen von N(3) zusammenfällt. Die restlichen Linienpositionen sind denjenigen der Tetrahydrofolsäure sehr ähnlich. Die Resonanz bei -251,3 ppm (entweder N(5) oder N(10)) liegt im Bereich der Werte für Imidazoliniumsysteme [62] wie man dies für Struktur 6 auch erwarten würde.

Dihydropterine

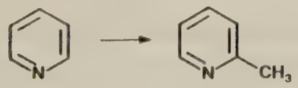
6,7-Dimethyl-7,8-dihydropterin, im Gegensatz zu 7,8-Dihydrofolsäure, ist über längere Zeit stabil in TFA-Lösung. Eine röntgenkristallographische Untersuchung am Monohydrochlorid von 6,7-Dimethyl-7,8-dihydropterin hat ergeben, dass diese Verbindung an N(5) protoniert vorliegt. Das ^{15}N Spektrum der gleichen Verbindung in TFA legt nahe, dass sowohl N(1) wie N(5) protoniert sind: die Resonanzen des Pyrimidinteils entsprechen denjenigen der tetrahydrierten Formen, während N(5) typisch für ein Iminiumstickstoff-

atom erscheint. Zudem weist das Signal von N(5) vollen NOE auf. Die chemische Verschiebung von N(5) ist bei der Unterscheidung verschieden hydrierter Pterine von besonderem diagnostischem Wert: sie liegt für 7,8-Dihydropterin signifikant bei tieferen Frequenzen als im entsprechenden Pterin und deutlich bei höheren als in der Tetrahydroform (vgl. auch Fig. 28).

Pterine

6,7-Dimethylpterin weist für die NH_2-Gruppe an C(2) ungefähr die gleiche chemische Verschiebung auf wie das Dihydro- und Tetrahydroderivat. Die Resonanzen von N(1) und N(3) erscheinen nach höheren Frequenzen verschoben - vermutlich eine Folge des ankondensierten aromatischen Systems. N(5) und N(8) sind in die Region der sp^2-Resonanzen gerückt. Ihre Zuordnung ist nicht gesichert.

In Folsäure sind die Unterschiede zwischen N(5) und N(8) wesentlich stärker ausgeprägt. Während ein Signal (-78,5 ppm) mit denjenigen von 6,7-Dimethylpterin vergleichbar ist, hat das andere eine Tieffeldverschiebung von ~ 20 ppm erfahren. Daraus lässt sich ableiten, dass es sich bei dem Signal bei -58,3 ppm um dasjenige von N(8) handeln muss. β-Methylsubstitution an Pyridin bewirkt eine Verschiebung in gleicher Richtung [2].



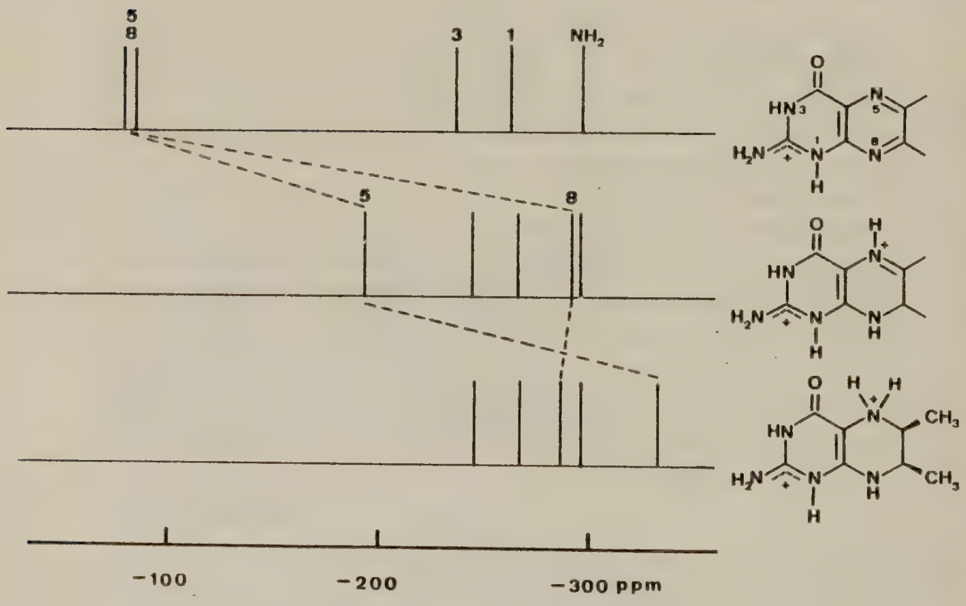
- 64 ppm - 72 ppm

Es muss an dieser Stelle bemerkt werden, dass die β-Substituenteninkremente für sp^3- und sp^2-substituierte Stickstoffatome in verschiedene Richtung laufen. Die übrigen Daten für Folsäure lassen sich durch Vergleich mit den

tetrahydrierten und dihydrierten Analogverbindungen leicht interpretieren.

Ein grafischer Vergleich der Spektren verschieden hydrierter Pterine findet sich in Fig. 28. Die Resonanzen des Pyrimidinteils werden in saurer Lösung durch die unterschiedliche Hydrierung kaum beeinflusst, während die Stickstoffresonanzen der Pyrazineinheit unterschiedliche Hybridisierung und Protonierung deutlich widerspiegeln.

Figur 28



3.2.4. Experimenteller Teil

Die Aufnahmen aller Spektren geschah mit Hilfe des 20 mm Probenkopfes. Unter Protonenrauschentkopplung erwärmten sich die Proben auf 40°. Typische Aufnahmeparameter beinhalten eine spektrale Breite von 5000 Hz, Pulsabstände von

4 sec bei einer Aquisitionszeit von 0,4 sec und einem Flipwinkel von 40°. Mit diesen Parametern wurden die rauschentkoppelten Spektren von ca. 0,7 M Lösungen protonierter Spezies nach Akkumulation von 1000 FID's erhalten.

Unter [63] finden sich alle Zitate zur Synthese und Reinigung der untersuchten Verbindungen.

3.3. Azimine und Azoxybenzole

Konfigurationszuordnungen an Doppelbindungen, von denen ein oder beide Zentren Stickstoffatome sind (Azo- und Azoxyverbindungen, Oxime, Imine, etc.), bereiten im allgemeinen Schwierigkeiten [64]. Die bisher zur Lösung dieses Problems eingesetzten Methoden, ^{1}H-und ^{13}C-NMR-, UV- und IR-Spektroskopie, gestatten meist keine endgültigen Aussagen; die spektralen Unterschiede zwischen den Isomeren sind meist klein und nicht vorhersagbar. Eindeutige Konfigurationszuordnung kann dann gemacht werden, wenn anstelle von ^{14}N das Isotop ^{15}N in die Untersuchungen miteinbezogen wird, denn

- Hybridisierung und effektive Kernladungen widerspiegeln sich in den ^{15}N chemischen Verschiebungen und in den ^{1}J-Kopplungskonstanten ($^{1}J(N,N)$, $^{1}J(N,C)$, $^{1}J(N,H)$) [16][65];
- Konfigurationszuordnungen sind aufgrund der Stereospezifität geminaler ^{15}N,X-Kopplungskonstanten ($^{2}J(N,C)$, $^{2}J(N,H)$) möglich. Diese sind für eine syn-Anordnung von C resp. H relativ zum freien Elektronenpaar stets signifikant grösser als für die entsprechende anti-Anordnung [15][21][66].

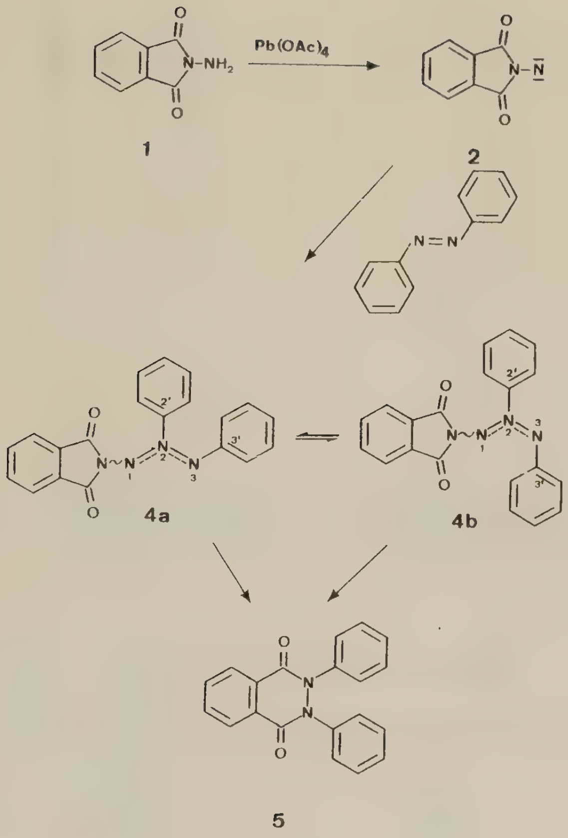
Addition von Phthalimidonitren (<u>2</u>), welches durch Bleitetraacetatoxydation aus N-Aminophthalimid (<u>1</u>) hergestellt wird, an <u>cis</u>- (oder <u>trans</u>-) Azobenzol (<u>3</u>), liefert zwei stereo-

isomere Produkte (Fig. 29) [67]. Ihre Strukturen wurden aufgrund von Analogieüberlegungen, insbesondere durch Vergleich der UV-Spektren mit denjenigen von cis- und trans-Azoxybenzol, cis- und trans-2,3-Diphenyl-1-phthalimidoazimin (4a resp. 4b) zugeordnet. Thermolyse der beiden Azimine führte zum gleichen Produkt (N,N'-Diphenylphthaloylhydrazin (5)). Der Beweis für die offenkettige Struktur von 4a und 4b sowie deren endgültige Konfigurationszuordnung entstammt der Analyse der ^{13}C-und ^{15}N-Kernresonanzspektren von $^{15}N(2)$ $^{15}N(3)$-cis- und trans-2,3-Diphenyl-1-phthalimidoazimin (6a und 6b in Fig. 30).

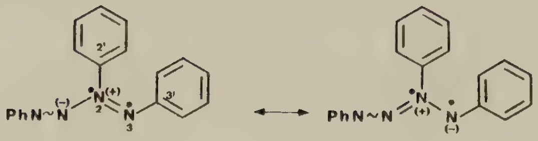
3.3.1. Resultate

Das protonengekoppelte ^{15}N-Spektrum von 6a besteht aus einem AB-System, dessen beide Linien bei höheren Frequenzen eine Triplettaufspaltung zeigen, während diejenigen bei tieferen Frequenzen deutlich verbreitert erscheinen (Fig. 31). Die chemischen Verschiebungen betragen -59,6 und -63,7, die $^{1}J(N,N)$-Kopplungskonstante 15 Hz. Das Spektrum der entsprechenden trans-Verbindung weist ein ähnliches Erscheinungsbild auf. Die vicinalen N,H-Kopplungen mit den aromatischen ortho-Protonen sind in beiden N-Resonanzen aufgelöst (~1,8 Hz). Die ^{15}N-Daten für beide Verbindungen sind zusammen mit denjenigen der iso-π-elektronischen Azoxybenzole in Tab. 9 zusammengefasst.

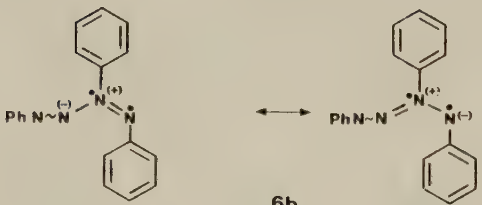
Hoher struktureller Informationsgehalt kommt den N,C-Kopplungskonstanten zu, wie sie den protonenentkoppelten ^{13}C Spektren entnommen werden können. Die Daten sind, wiederum mit denjenigen der Azoxybenzole, in Tab. 10 zu finden.



Figur 29

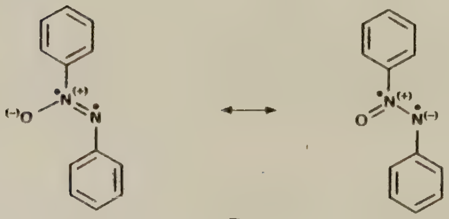


6a



6b

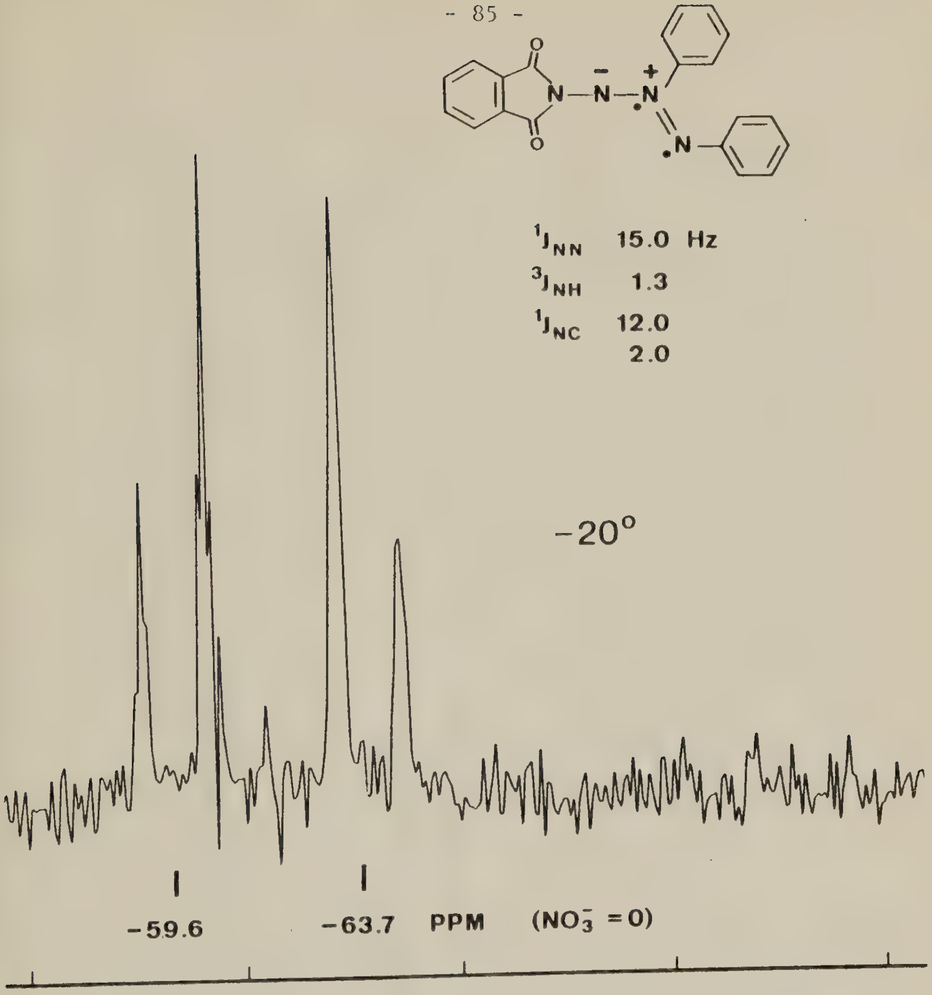
7a



7b

$^{\bullet}N = {}^{15}N$

Figur 30



<u>Figur 31</u> Unentkoppeltes ^{15}N-NMR-Spektrum von ^{15}N(2)^{15}N(3)-<u>cis</u>-2,3-Diphenyl-1-phthalimidoazimin, in $CDCl_3$, chemische Verschiebung relativ zu NO_3^-

Tabelle 9 ^{15}N-NMR-Daten [a)]

	δ(N-2)	δ(N-3)	Δν(N)	$^{1}J(N,N)$
cis-Azimin 6a (m.p. 127°C)	-63,7[b]	-59,6	42,3[c]	15,0[c]
trans-Azimin 6b (m.p. 131°C)	-64,7[d]	-60,5	42,6	13,4
cis-Azoxybenzol[e] 7a	-36,0[d]	-19,8	163,8	12,5
trans-Azoxybenzol[e] 7b	-54,1[d]	-46,7	74,0	12,5 (13,7[f])

a) Gemessen bei 10,1 MHz in $CDCl_3$ Lösung bei -20°C

b) In ppm relativ zu externem NO_3^-

c) In Hz

d) Zuordnung in Analogie zu 6a

e) Doppelt markiert mit ^{15}N

f) Gemessen bei 30°C ohne Protonenentkopplung [19]

Tabelle 10 ^{13}C NMR Daten[a)]

	δ(C-2')	δ(C-3')	^{1}J(N-2,C-2')	^{1}J(N-3,C-3')	^{2}J(N-3,C-2')	^{2}J(N-2,C-3')
cis-Azimin 6a (m.p.127°C)	141,7[b]	146,9	12,3[c]	2,0	2,0	<0,5
trans-Azimin 6b (m.p.131°C)	145,1	145,2	13,6	3,0	6,9	1,5
cis-Azoxybenzol[d] 7a	152,6	148,3	12,5	1,3	2,5	<0,5
trans-Azoxybenzol[d] 7b	148,5	143,9	18,2	3,7	9,4	<0,5

a) Gemessen bei -20°C in $CDCl_3$ Lösung bei 25.2 MHz
b) In ppm relativ zu internem TMS
c) In Hz
d) Doppelt markiert mit ^{15}N

3.3.2. Diskussion

Die Nichtäquivalenz der beiden Stickstoffatome geht aus den ^{15}N-Spektren deutlich hervor. Während im Fall von 6b in beiden Resonanzen eine Triplettaufspaltung - hervorgerufen durch die ortho-Protonen am Phenylsubstituenten - auftritt, erscheinen die Tieffrequenzlinien von 6a unstrukturiert. Ihre Halbhöhenbreite lässt aber dennoch auf eine vicinale N,H-Kopplung schliessen, die derjenigen des Hochfrequenzastes vergleichbar ist. Die Verdeckung des Aufspaltungsmusters könnte daher einer Restkopplung mit dem benachbarten ^{14}N-Kern zugeschrieben werden. Unter der plausiblen Annahme, dass $^{1}J(^{14}N^{15}N) > {}^{2}J(^{14}N^{15}N)$, kann auf diese Weise das Signal bei -63,7 ppm N(2), dasjenige bei -59,6 ppm N(3) zugeordnet werden. Die Zuordnung der Signale der trans-Verbindung sowie der beiden Azoxybenzole (7a,b) geschah in Analogie zu 6a.

Das Datenmaterial über direkte N,N-Kopplungskonstanten ist noch nicht ausreichend, um fundierte oder gar quantitative Aussagen über ihre Abhängigkeiten zu machen. Die gefundenen Werte stehen indes in Einklang mit Literaturdaten für Verbindungen, von denen $^{1}J(N,N)$ benachbarter sp^2 Stickstoffatome beschrieben sind [68].

Theoretische Arbeiten über $^{1}J(N,C)$-Kopplungskonstanten haben deren hauptsächliche Abhängigkeit vom Fermi Kontakt-Term gezeigt [16]. Demzufolge wurden die grösseren der gemessenen Kopplungskonstanten als $^{1}J(N(2)C(2'))$ gewertet, währenddem die kleinen Konstanten den Interaktionen von N(3) mit C(3') zugeschrieben wurden. Die Verschiedenheit der direkten N,C-Kopplungskonstanten bestätigt die grossen Unterschiede in den elektronischen Umgebungen der beiden N-Atome sowie die Dipolformulierung (6) mit einer positiven Teilladung auf N(2). Zusätzlich erlaubt sie eine eindeutige Unterscheidung von cis- und trans-Isomerem mit Hilfe geminaler N,C-Kopplungskonstanten.

Der Betrag von $^{2}J(N,C)$ ist von der Orientierung des freien Elektronenpaares relativ zum geminalen Kohlenstoffatom abhängig. Dabei werden stets grössere Werte für die synperiplanare als für die antiperiplanare Anordnung gemessen. Die Aufspaltung von 6,9 Hz im C(2') Signal, welches vorher mit Hilfe der $^{1}J(N,C)$ Kopplung zugeordnet wurde, entspricht demzufolge dem trans-Azimin 6b, währenddem die Aufspaltung von 2 Hz dem cis-Isomeren 6a entspricht. Die gleiche Argumentierung kann auf die Azoxybenzole übertragen werden, deren $^{2}J(N,C)$ mit 9,4 Hz für die trans- und 2,5 Hz für die cis-Verbindung die bekannten Konfigurationen bestätigen. Die etwas grösseren Beträge im Vergleich zu den Aziminen lassen sich durch die Substitution von N durch den elektronegativeren Sauerstoff erklären, wodurch die effektive Kernladung und damit die Fermi Kontakt Wechselwirkung eine Vergrösserung erfährt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ^{15}N-Daten, inklusive $^{1}J(N,C)$ und $^{2}J(N,C)$ Kopplungskonstanten, dazu geeignet sind, Substitution und Konfiguration an N=N-Doppelbindungen abzuklären.

3.4. ^{15}N-NMR-Spektroskopie an lebenden Zellen

Die Kernresonanzspektroskopie wird in immer stärkerem Mass bei der Bearbeitung biologischer Fragestellungen eingesetzt. Wie keine andere spektroskopische Methode zeichnet sie sich durch eine energiemässig gesehen hohe Auflösung aus, sodass sich auch schwache intermolekulare Wechselwirkungen in einer Veränderung des Kernresonanzspektrums äussern. Zudem führt die Interpretation der Spektren in direkter Weise auf die funktionellen Gruppen, was besonders bei mechanistischen Studien wünschenswert erscheint. Der Anwendung auf biologische Systeme sind indessen durch die geringe Empfindlichkeit Grenzen gesetzt. Dies gilt insbesondere für die

Spektroskopie der Kerne mit geringem natürlichem Vorkommen - ^{13}C und ^{15}N -, welche andererseits wegen der Einfachkeit ihrer Spektren der ^{1}H-Kernresonanzspektroskopie überlegen sind. Biologisch interessante Moleküle können aus Löslichkeitsgründen oft nur in geringer Konzentration vermessen werden. Noch schärfer akzentuiert sich das Empfindlichkeitsproblem, wenn ein Molekül innerhalb eines biologischen Systems studiert werden soll. Mit Hilfe der ^{13}C-Spektroskopie konnten Stoffwechselvorgänge, ausgehend von markierten Vorläufern, NMR-spektroskopisch selbst innerhalb lebender Zellen verfolgt werden [69][70]. Im Rahmen der nachfolgenden Studie sollte gezeigt werden, dass eine Beobachtung von ^{15}N in der Zelle grundsätzlich ebenfalls möglich ist [71].

3.4.1. Substanzprobe

Der Pilz Ustilago sphaerogena wurde bei 30°C in einem eisenarmen Medium gezüchtet, wobei als einzige Stickstoffquelle ^{15}N-Ammoniumacetat angeboten wurde. Der Eisenmangel hat neben einer Wachstumsverlangsamung zur Folge, dass die Produktion von Ferrichrompeptiden induziert wird. Diese, im vorliegenden Experimentaufbau ^{15}N markiert, kamen in einer anderen Studie zur Anwendung. Die Zellen wurden am 17. Tag nach Inokulierung durch Zentrifugation gewonnen. Aus 3,3 l Kulturmedium wurden etwa 10 ml einer Zellpaste erhalten. Diese wurde ohne weitere Behandlung in einem 12 mm Röhrchen vermessen. Die Zellen blieben dabei voll lebensfähig; sie waren anschliessend als Inokulum für neue Kulturen verwendungsfähig. Die bei der Zentrifugation anfallende Nährlösung wurde gleichermassen vermessen. In einem weiteren Experiment wurden etwa 3 ml Zellpaste im Kulturmedium während 9 Tagen bei 3°C gealtert, daraufhin abzentrifugiert und bei 10°C über Nacht in destilliertem Wasser gewaschen. Durch erneute Zentrifuga-

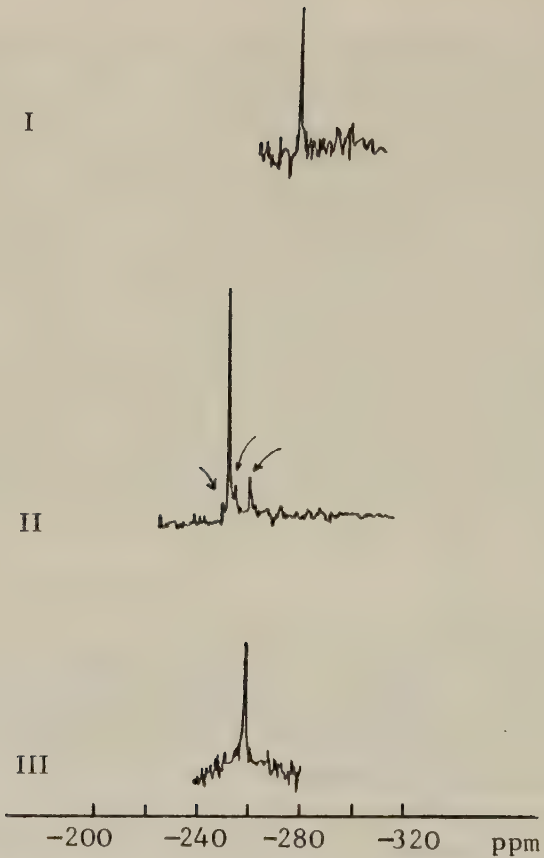
tion wurde eine Zellpaste erhalten, welche ebenfalls ohne weitere Bearbeitung vermessen wurde.

3.4.2. ^{15}N-Spektren

Das ^{1}H-rauschentkoppelte Spektrum der frischen Zellen (Fig. 32a) zeigt eine Gruppe von vier ausgezeichneten Resonanzlinien bei -249,8 ppm, -253,8 ppm, -256,2 ppm und -261,9 ppm. Die Intensität des Signals bei -253,8 ppm übertrifft die andern um ein Zehnfaches. Weitere diskrete Linien im Bereich von 30 bis -470 ppm traten keine auf. Das Spektrum der Nährlösung zeigt unter den gleichen Aufnahmebedingungen nur eine einzige Linie bei -280 ppm. Ebenfalls eine einzige Linie, jedoch bei einer buckligen Grundlinie, weist das Spektrum der gewaschenen Zellen auf (-261,9 ppm).

3.4.4. Diskussion

Obwohl durch die gewählten Zuchtbedingungen jedes einzelne Stickstoffatom der Zellen ein ^{15}N-Isotop war, zeigte das Spektrum nur wenige, relativ scharfe Resonanzlinien. Dies kann damit erklärt werden, dass alle N-Atome, welche Teile von Makromolekülen sind, durch nicht ausgemittelte dipolare Kopplungen aufgespalten und damit in ihrer Intensität reduziert werden. Ebenfalls nicht sichtbar sind Resonanzen, die keinen oder nur einen ungünstigen NOE aufweisen. Dies ist immer dann der Fall, wenn die 'extreme narrowing condition' durch lange Korrelationszeiten verletzt wird. Es bleiben also lediglich kleine Moleküle übrig, die sich zudem im Zellplasma relativ frei bewegen können, d.h. nicht an Membrane assoziiert sind. Die Frequenzregion, in der die Signale beobachtet wurden (-250 bis -262 ppm) ist typisch für Peptidylamide im pH Bereich 4 bis 10. Sicher ausgeschlossen werden können freie Aminosäuren (-290 bis -350 ppm) ausser Histidin und Tryptophan, Harnstoff (-300 ppm)



Figur 32 ^{1}H-rauschentkoppeltes ^{15}N-Spektrum einer ^{15}N-angereicherten Kultur von Ustilago Sphaerogena I Zellfreies Kulturmedium, II Frische Zellpaste, III Zellpaste bei 3° während 9 Tagen gealtert und mit H_2O vor der Messung gewaschen

und Ammoniumionen (-354 ppm). Die Linienbreite der Signale ist deutlich geringer als diejenige von ^{15}N-Hämoglobin wie sie von Lapidot et al.[72] beobachtet wurde. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich um kleine Peptide aus dem Pool der niedermolekularen Fragmente der Peptidsynthese handelt. U.sphaerogena produziert unter den Zuchtbedingungen Ferrichrom-Cyclohexapeptide, welche eine

Triornithylsequenz enthalten. Dies bedeutet, dass die Stoffwechselaktivität im Harnstoffzyklus besonders gross ist, sodass es nicht erstaunlich ist, wenn niedermolekulare Peptide in grösseren Konzentrationen auftreten. Ein Vergleich der Spektren a und b zeigt im weitern, dass die Signale der frischen Zellen nicht etwa von Kulturmediumresten in der Zellpaste herrühren, sondern tatsächlich aus dem Zellinnern stammen. Nimmt man an, dass das Signal bei -261 ppm im Spektrum der frischen Zellen von der gleichen Substanz herrührt wie dasjenige bei -260 ppm der gealterten Zellen, so liegt es nahe, dass die Verbindungen, welche zu den restlichen Signalen Anlass gaben, entweder metabolisiert wurden oder aber ins Nährmedium resp. Waschwasser diffundierten.

III. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Dissertation hatte zum Ziel, die Anwendbarkeit der ^{15}N-NMR Spektroskopie in natürlicher Isotopenhäufigkeit zu untersuchen. Die ausserordentlich geringe Empfindlichkeit der Methode zwang uns zu einer Verbesserung der bestehenden Instrumentierung. Zu diesem Zweck haben wir einen Messkopf für grossvolumige Proberöhrchen gebaut. Die Beschreibung dazu findet sich in Kapitel II/2. Die erreichte Empfindlichkeitssteigerung gegenüber dem kommerziellen Probenkopf entspricht einem Faktor von 3-4, wodurch sich die Messzeit um einen Faktor von 9-16 reduziert. Die Auflösung hat durch die Volumenvergrösserung nicht gelitten: Die Linienbreite des Nitratsignals ist nach wie vor geringer als 1 Hz.

Anwendungsbeispiele für Messungen in natürlicher Isotopenhäufigkeit finden sich in den Kapiteln II/3.1 und II/3.2.

In Kapitel II/3.1 wird über die chemischen Verschiebungen von 32 Enaminen, 11 Enaminoketonen und 28 eng verwandten Aminen berichtet. Substituenteneffekte wurden durch Bildung differentieller chemischer Verschiebungen ($\Delta\delta(N) = \delta_N$(Amin) - δ_N(Enamin)) eliminiert. Dieser Parameter, welcher als Sonde zum Studium von n,π-Wechselwirkungen in Enaminen vorgeschlagen wird, korreliert mit der freien Aktivierungsenthalpie $\Delta G^{\neq}$ der behinderten Rotation um die N-C(α)-Bindung in Enaminen mit erweiterter Konjugation. Die $\Delta\delta(N)$-Werte substituierter Anilinostyrole korrelieren ebenfalls mit den chemischen Verschiebungen der β-Kohlenstoffatome der Enaminsysteme sowie mit den Hammett-σ-Konstanten der Anilinsubstituenten.

In Kapitel II/3.2 finden sich die ^{15}N-chemischen Verschiebungen einer Reihe von 5,6,7,8-Tetrahydropterinen, 7,8-Dihydropterinen sowie von Pterinen. Diese Verbindungen

wurden in TFA-Lösung mit Hilfe des 20 mm Probenkopfes vermessen. Von besonderem Interesse sind die Daten für Folsäure, 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure und N(5),N(10)-Metheno-5,6,7,8-tetrahydrofolsäure, da es sich um Moleküle von biologischer Relevanz handelt. Pterine unterschiedlicher Oxydationsstufe im Pyrazinring können anhand der ^{15}N-chemischen Verschiebungen von N(5) und N(8) leicht erkannt werden. Das nicht triviale Problem der Zuordnung der Resonanzlinien wurde mit Alkyl-Substituenteneffekten, Protonierungsstudien und durch Spektrenvergleich gelöst.

Beispiele für den Einsatz der ^{15}N-Resonanz mit Isotopenanreicherung finden sich in den Kapiteln II/3.3 und II/3.4.

In II/3.3 wurden ^{15}N-chemische Verschiebungen, $^{1}J(N,N)$-, $^{1}J(N,C)$- und $^{2}J(N,C)$-Kopplungskonstanten benutzt, um die offenkettige Struktur sowie die Konfiguration von <u>cis</u>- und <u>trans</u>-2,3-Diphenyl-1-phthalimidoaziminen zu beweisen. Zum Vergleich werden die entsprechenden Daten für die iso-π-elektronischen <u>cis</u>- und <u>trans</u>-Azoxybenzole ebenfalls diskutiert.

Der Beweis, dass auch die unempfindliche ^{15}N-NMR-Spektroskopie in der Lage ist, Signale von Substanzen in lebenden Zellen zu empfangen, findet sich in Kapitel II/3.4. Obwohl der ganze Pilzorganismus unserer Messprobe ausschliesslich aus ^{15}N aufgebaut wurde, weist das Spektrum nur wenige scharfe Linien auf, welche Peptiden im Zellinneren zugeordnet werden.

IV. LITERATUR

[1] W.G. Proctor und F.C. Yu, Phys. Rev. 77, 717 (1950)

[2] 'Nitrogen NMR', M. Witanowski und G.A. Webb edit. Plenum Press 1973

[3] H.C. Torrey, Phys. Rev. 76, 1059 (1949)

[4] J.P. Marchal und J. Canet, J. Amer. chem. Soc. 97, 6581 (1975)

[5] T.C. Farrar und E.D. Becker, 'Puls and Fourier Transform NMR', Academic Press 1971

[6] R.R. Ernst und W.A. Anderson, Rev. Sci. Instr. 37, 93 (1966)

[7] A. Saika und C.P. Slichter, J. chem. Phys. 22, 26 (1954)

[8] M. Witanowski, L. Stefaniak und G.A. Webb in 'Annual Reports on NMR Spectroscopy', E.F. Mooney (ed.), Vol. 7, 117 (1977)

[9] K.A.K. Ebraheem und G.A. Webb, Org. magn. Reson. 9, 248 (1977)

[10] E.D. Becker, R.B. Bradley und T. Axenrod, J. magn. Reson. 4, 136 (1971)

[11] M. Witanowski, L. Stefaniak, S. Szymanski und H. Januszewski, J. magn. Reson. 28, 217 (1977)

[12] P.R. Srinivasan und R.L. Lichter, J. magn. Reson. 28, 227 (1977)

[13] IUPAC Empfehlung, Pure and Appl. Chem. 45, 217 (1976)

[14] N.F. Ramsey, Phys. Rev. 91, 303 (1953)

[15] S. Nagata, T. Yamabe, K. Hirao und K. Fukui, J. phys. Chem. 79, 1863 (1975)

[16] J.M. Schulman und T. Venanzi, J. Amer. chem. Soc. 98, 4701 (1976)

[17] J.M. Schulman und T. Venanzi, J. Amer. chem. Soc. 98, 6741 (1976)

[18] R. Wasylishen und T. Schaefer, Can. J. chem. 50, 2989 (1972)

[19] G. Binsch, J.B. Lambert, B.W. Roberts und J.D. Roberts, J. Amer. chem. Soc. 86, 5564 (1964)

[20] A.J.R. Bourn und E.W. Randall, Mol. Phys. 8, 567 (1964)

[21] D. Crepaux, J.M. Lehn und R.R. Dean, Mol. Phys. 16, 225 (1969)

[22] M. Barfield und H.L. Gearhart, Mol. Phys. 27, 889 (1974)

[23] V.F. Bystrov, Y.D. Gavrila und V.N. Solkan, J. magn. Reson. 19, 123 (1975)

[24] W. Schwotzer, Ch. Leuenberger, L. Hoesch, A.S. Dreiding und W. von Philipsborn, Org. magn. Reson. 9, 382 (1977)

[25] J.H. Noggle und R.E. Schirmer, 'The Nuclear Overhauser Effect', Academic Press 1971

[26] K.F. Kuhlmann, D.M. Grant und R.K. Harris, J. chem. Phys. 52, 3439 (1970)

[27] C.S. Irving und A. Lapidot, J. Amer. chem. Soc. 97, 5945 (1975)

[28] J.B. Lambert und D.A. Netzel, J. magn. Reson. 25, 531 (1977)

[29] C.G. Levy, C.E. Holloway, R.C. Rosanske, J.M. Hewitt und C.H. Bradley, Org. magn. Reson. 8, 643 (1976)

[30] D. Schweitzer und H. Spiess, J. magn. Reson. 16, 243 (1974)

[31] K.A. Christensen, D.M. Grant, E.M. Schulman und C. Walling, J. Phys. Chem. 78, 1971 (1974)

[32] G.E. Hawkes, W.M. Litchman und E.W. Randall, J. magn. Reson. 19, 255 (1976)

[33] R.R. Ernst, J. chem. Phys. 45, 3845 (1966)

[34] R. Freeman, H.D.W. Hill und R. Kaptein, J. magn. Reson. 7, 327 (1972)

[35] K.F. Kuhlmann und D.M. Grant, J. chem. Phys. 55, 2998 (1971)

[36] D. Canet, J. magn. Reson. 23, 361 (1976)

[37] A.J. DiGioia und R.L. Lichter, J. magn. Reson. 27, 431 (1977)

[38] A. Abragam, 'The Principles of Nuclear Magnetism', Clarendon Press, Oxford (1961)

[39] D.I. Hoult und R.E. Richards, J. magn. Reson. 24, 71 (1976)

[40] H. Koch, 'Transistorempfänger', Franzis-Verlag München (1975)

[41] VARIAN Probe Manual

[42] R.A. Byrd und P.D. Ellis, J. magn. Reson. 26, 169 (1977)

[43] 'Enamines', A.G. Cook edit., M. Dekker, New York, 1969

[44] S.K. Malhotra, in [43]

[45] G.R. Bedford und P.J. Taylor, Org. magn. Reson. 9, 49 (1977)

[46] K. Nagarajan und S. Rajappa, Tetrahedron Letters 1969, 2293

[47] W.D. Gurowitz und M.A. Joseph , J. org. Chemistry 32, 3289 (1967)

[48] E.J. Lone, R.H. Garner und A.W. Hayes, J. org. Chemistry 37, 4436 (1972)

[49] D. Tourwé, G. Van Binst, S.A.G. DeGraaf und U.K. Pandit, Org. magn. Reson. 7, 433 (1975)

[50] R.L. Lichter und J.D. Roberts, J. Amer. chem. Soc. 94, 2495 (1972)

[51] G.J. Martin, J.P. Gouesnard, J. Dorie, C. Rabiller und M.L. Martin, J. Amer. chem. Soc. 99, 1381 (1977)

[52] P.W. Westerman und J.D. Roberts, J. org. Chemistry 42, 2249 (1977)

[53] W. Schwotzer und W. von Philipsborn, Helv. 60, 1501 (1977)

[54] a) A. Dieffenbacher, R. Mondelli und W. von Philipsborn, Helv. 49, 1355 (1966)

b) A. Dieffenbacher und W. von Philipsborn, ibid 52, 743 (1969)

[55] a) J.H. Bieri und M. Viscontini, Helv. 57, 1651 (1974)
b) R. Weber und M. Viscontini, Helv. 58, 1772 (1975)
c) R. Weber und M. Viscontini, Helv. 59, 2379 (1976)
d) H.J. Furrer, J.H. Bieri und M. Viscontini, Helv. 61, 2744 (1978)
e) M. Poe und K. Hoogsteen, J. biol. Chemistry 253, 543 (1978)

[56] a) G. Müller und W. von Philipsborn, Helv. 56, 2680 (1973)
b) U. Ewers, H. Günther und L. Jaenicke, Chem. Ber. 106, 3951 (1973)
c) W. Frick, R. Weber und M. Viscontini, Helv. 57, 2658 (1974)

[57] a) A. Bobst und M. Viscontini, Helv. 49, 875 (1965)
b) R.G. Kallen und W.P. Jencks, J. biol. Chemistry 241, 5845 (1966)

[58] J.H. Bieri und M. Viscontini, Helv. 60, 1926 (1977)

[59] J.H. Bieri, Helv. 60, 2303 (1977)

[60] V. M. Markowski, G.R. Sullivan und J.D. Roberts, J. Amer. Chem. Soc. 99, 714 (1977)

[61] R.L. Blakley, The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines, Wiley, New York 1969

[62] R. Mérényi in 'Iminium Salts in Org. Chemistry', H. Böhm und H.G. Viehe edits., Interscience, 1977

[63] W. Schwotzer, J.H. Bieri, M. Viscontini und W. von Philipsborn, Helv. 61, 2108 (1978)

[64] B.T. Newbold, in 'The Chemistry of Hydrazo, Azo und Azoxy groups', Part 2, S. Patai ed., Wiley (1975)

[65] S. Bulusu, J.R. Autera und T. Axenrod, in 'NMR Spectroscopy of Nuclei other than Protons', T. Axenrod und G.A. Webb edits., Wiley (1974)

[66] R.L. Lichter, D.E. Dorman und R. Wasylishen, J. Amer. chem. Soc. 96, 930 (1974)

[67] Ch. Leuenberger, M. Karpf, L. Hoesch und A.S. Dreiding, Helv. 60, 831 (1977)

[68] H. Schultheiss und E. Fluck, Z. Naturforsch. 32b, 257 (1977)

[69] J.D. Robinson, N.J.M. Birdsall, A.G. Lee und J.C. Metcalfe, Biochemistry 11, 2903 (1972)

[70] R.E. London, C.T. Gregg und N.A. Matwiyoff, Science 188, 266 (1975)

[71] M. Llinas, K. Wüthrich, W. Schwotzer und W. von Philipsborn, Nature 257, 817 (1975)

[72] A. Lapidot, C.S. Irving und Z. Malik, in Proc. First int. Conf. Stable Isotopes Chem., Biol. Med. (P.D. Klein und S.U. Peterson edits.) Argonne natn. Lab, Argonne, Illinois, 1973

Curriculum Vitae

Am 23. Juli 1948 wurde ich, Willi Schwotzer, in Thal SG als Bürger von Grub/Eggersriet SG geboren. Von 1955-61 besuchte ich die Primar-, von 1961-64 die Sekundarschule in Rheineck SG. 1964 trat ich ins Gymnasium der Kantonsschule St. Gallen ein, welches ich 1968 mit der Matura (Typ B) abschloss. Im Herbst 1968 immatrikulierte ich mich an der Universität Zürich. Im Frühling 1974 erwarb ich das Diplom als Naturwissenschafter mit Hauptfach Chemie. Ich begann anschliessend unter der Leitung von Herrn Prof. W. von Philipsborn mit der vorliegenden Dissertation.

Von 1975 bis 1978 bekleidete ich eine Assistentenstelle am Organisch-chemischen Institut.

Während meiner Ausbildung besuchte ich Vorlesungen und Kurse bei folgenden Dozenten: R. Bachofen, M.A. Billeter, K. Bernauer, P. Christen, A.S. Dreiding, R.R. Ernst, C.H. Eugster, H. Fischer, M. Hesse, H.J. Hediger, R. Humbel, J. Kägi, W. Kündig, H. Labhart, F. Leuthardt, W. Ludwig, V. Meyer, H.R. Oswald, W. v.Philipsborn, H. Schmid, M. Viscontini, B.L. van der Waerden, G. Wagnière, H. Wanner, Ch. Weissmann, H. Werner.